

**Untersuchungen zu Schwefelverbindungen und  
Enzymaktivitäten in *Allium*-Arten des Subgenus  
*Melanocrommyum***

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anja Vogt

aus Wuppertal

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen

am .....

Erstgutachter: Prof. Dr. Keusgen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Li

Tag der mündlichen Prüfung am 19.12.2008

**Meinen Eltern und meiner Schwester**

*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.*

Albert Einstein

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Keusgen für die Überlassung des interessanten Themas, seine unermüdliche Unterstützung und sein Engagement sowie für sein Vertrauen, das er mir und meiner Arbeit immer wieder entgegen gebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Li danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates. Ausserdem danke ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Prof. Dr. Petersen und Prof. Dr. Bakowsky.

Herrn Dr. Fritsch möchte ich danken für die Sammlung und die Bereitstellung der *Allium*-Proben, die taxonomische Zuordnungen und seine Hilfe. Ausserdem sei an dieser Stelle allen Kooperationspartnern des PharmAll Projektes und der VW-Stiftung für die Finanzierung des Projektes gedankt.

Ich danke meiner ganzen Arbeitsgruppe für die gute Atmosphäre und den Spaß während und nach der Arbeitszeit, sowie Floris van Elsäcker und Matthias Brauschke für ihre unersätzbliche praktische Hilfe im Labor und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für alle Probleme hatten.

Dr. Uwe Reinscheid danke ich für die viele Hilfe bezüglich NMR-Messungen und der guten Zusammenarbeit für die Publikation. Dank auch an die MS-und NMR-Abteilung des Institutes für die Hilfe und die Messungen, besonders an Nina, Heike und Frau Dr. Laufenberg für die gute Zusammenarbeit.

Dank auch an Verena Janiak und die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petersen für die Hilfe bei den Anlaufschwierigkeiten mit der Gelelektrophorese.

Außerdem danke ich meinen Kollegen bei der Praktikumsbetreuung für die vielen netten Tage und den Spaß den wir hatten.

Thanks to my "new" working group in Saskatoon for their friendly welcome and their support.

Ich danke meine Freunden, die immer für mich da waren und ein offenes Ohr für alle Probleme hatten.

Besonders danke ich meinen Eltern und Ilona und Patrick, ohne deren Unterstützung und Interesse diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Uwe für seine Liebe, sein Verständnis, seine Geduld und sein Vertrauen in mich.

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	1
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	8
<b>1. Einleitung</b>	11
1.1 Die Gattung <i>Allium</i>	11
1.2 Bedeutung der Gattung <i>Allium</i>	12
1.3 Inhaltsstoffe der <i>Allium</i> -Arten	13
1.3.1. Cysteinsulfoxide	14
1.3.2 Alliinase	15
1.3.3 primäre und sekundäre Aromakomponenten	17
1.3.4 $\gamma$ -Glutamylpeptide	19
1.3.5 Andere Enzyme	19
1.3.6 Steroide in <i>Allium</i> -Arten	20
1.3.7 Weitere Inhaltsstoffe	21
1.4 Arten des Subgenus <i>Melanocrommyum</i>	22
1.5 Steroidglykoside in Pflanzen	23
1.5.1 Steroidsaponine des Subgenus <i>Melanocrommyum</i>	24
1.5.2 Hoodia-Arten und Steroidsaponine	26
1.6 Verfärbungen von Lebensmittel	33
1.6.1 Enzymatische Verfärbungsreaktionen	33
1.6.2 Nicht enzymatische Verfärbungsreaktionen	34
1.6.3 Verfärbungen von <i>Allium</i> -Arten	34
1.7 Ziel der Arbeit	40
<b>2. Material und Methoden</b>	42
2.1 verwendete Chemikalien	42
2.2 Pflanzenmaterial	45
2.3 Lösungen und Puffer	51
2.3.1 Lösungen und Puffer für die Precursorextraktion und für die Cysteinsulfoxiduntersuchung	51
2.3.2 Lösungen und Puffer für die Proteinextraktion und Untersuchung	52

2.3.3 Lösungen und Puffer für die Gel- und Affinitätschromatographie	54
2.3.4 Lösungen und Puffer für die Aktivitätsbestimmungen	56
2.3.5 Verwendete Geräte	58
2.4 Allgemeine Vorschriften	59
Parameter der HPLC-MS- und MS/MS- Messungen	59
Parameter der HR-MS und NMR Messungen	60
Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von <i>Allium</i> Extrakten	60
Herstellung der synthetischen Cysteinsulfoxide	61
Quantitative Bestimmung der Cysteinsulfoxide nach Derivatisierung mit OPA	61
Proteinlösungen	62
2.5 Isolierung des Farbstoff-Precursors	63
2.5.1 Darstellung der enzyminaktivierten Rohextrakte	63
2.5.2 Aufreinigung der Rohextrakte durch HPLC	63
2.5.3 Überprüfung der Aufreinigung mittels Massenspektrometrie	64
2.5.4 Bestimmung der optischen Rotation	66
2.6 Proteinextraktion und -bestimmung	66
2.6.1 Proteinextraktion	66
2.6.2 Optischer Schnelltest auf enzymatische Aktivität	67
2.6.3 Proteinmengenbestimmung nach Lowry und Bradford	67
2.6.4 Proteingelanalytik	68
2.7 Enzymaufreinigung	73
2.7.1 Gelchromatographie	73
2.7.2 Affinitätschromatographie an einer Con A Säule	73
2.7.3 Affinitätschromatographie an einer Nickelsäule	74
2.7.4 Affinitätschromatographie an einer <i>Lens culinaris</i> -Lektin-Säule	75
2.8 Aktivitätsbestimmungen	75
2.8.1 Bestimmung der Enzymaktivität der Alliinase-ähnlichen Funktion	76
2.8.2 Bestimmung des pH-Optimums	77
2.8.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums	77
2.8.4 Michaelis-Menten Kinetik	78

2.8.5 Bestimmung der Substratspezifität	82
2.8.6 Hemmung der enzymatischen Aktivität	82
2.8.7 Bestimmung der Polyphenoloxidase-Aktivität	83
2.8.8 Bestimmung der kinetischen Parameter der Polyphenoloxidase-Aktivität	84
2.8.9 Substratspezifität der Polyphenoloxidase-Aktivität	85
2.8.10 Hemmung der Polyphenoloxidase-Aktivität und Effekte von Metallionen	85
2.8.11 Bestimmung der Aktivität der Farbstoffbildung	86
2.8.12 Bestimmung der kinetischen Parameter der Aktivität der Farbstoffbildung	86
2.9 Farbstoff	87
2.9.1 Herstellung der Farbstoffextrakte	87
2.9.2 Aufreinigung der Farbstoffextrakte	88
2.9.3 MS/MS Messungen der Farbstoffextrakte	88
2.9.4 HPLC-MS Messungen der Farbstoffextrakte	89
2.10 Inhaltstoffe von <i>A. stipitatum</i>	89
2.10.1 Extrakte von <i>A. stipitatum</i>	89
2.10.2 MS/MS und HPLC-MS Messungen der Extrakte von <i>A. stipitatum</i>	90
2.11 Extrakte von <i>Allium</i> Arten zur Steroidbestimmung	91
2.11.1 HPLC-MS Messungen zur Steroidbestimmung	91
2.12 Extrakte von <i>Hoodia</i> und verwandten Arten zur Steroidbestimmung	92
2.12.1 MS/MS und HPLC-MS Messungen der Extrakte	93
<b>3. Ergebnisse</b>	95
3.1 Farbstoff Precursor	95
3.1.1 Isolierung des Farbstoff Precursors	95
3.1.2 Strukturaufklärung des Precursors	97
3.2 Proteinuntersuchungen	103
3.2.1 Ergebnisse der Proteinextraktion	103
3.2.1.1 Bestimmung des Proteingehaltes	103
3.2.1.2 Proteingelanalytik	105
3.2.1.2.1 Vergleich unterschiedlicher Arten	105
3.2.1.2.2 Vergleich innerhalb einzelner Arten	106



3.3 Aufreinigung eines unbekannten Enzyms	110
3.3.1 Enzymaufreinigung: Gelchromatographie	110
3.3.2 Proteinfraction A	111
3.3.2.1 Enzymaufreinigung: Affinitätschromatographie über eine Con A Säule	111
3.3.2.2 Enzymaufreinigung: Eigenschaften des Proteinfraction A	113
3.3.3 Proteinfraction B	115
3.3.3.1. Enzymaufreinigung: Affinitätschromatographie über eine <i>Lens culinaris</i> -Lektin-Säule	115
3.3.3.2 Enzymaufreinigung: Metall-chelat-Komplex Chromatographie an einer Nickel-Säule	116
3.3.3.3 Enzymaufreinigung: Kombination der Aufreinigung mit einer Nickel-Chelat- und einer <i>Lens culinaris</i> -Lektin-Säule	118
3.3.3.4 Enzymaufreinigung: Eigenschaften der Proteinfraction B	119
3.4 Kinetische Parameter der isolierten Proteinfraction B	121
3.4.1 Charakterisierung der Alliinase-ähnlichen Aktivität	121
3.4.1.1 Bestimmung des pH-Optimums	122
3.4.1.2 Bestimmung des Temperatur-Optimums	124
3.4.1.3 Michaelis-Menten-Kinetik	125
3.4.1.4 Bestimmung der Substratspezifität	128
3.4.1.5 Hemmung der enzymatischen Aktivität	131
3.4.2 Charakterisierung der Polyphenoloxidase-Aktivität	132
3.4.2.1 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten	132
3.4.2.2 Bestimmung des pH-Optimums	133
3.4.2.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums	135
3.4.2.4 Michaelis-Menten-Kinetik	137
3.4.2.4.1 Brenzcatechin	138
3.4.2.4.2 Dopamin	139
3.4.2.4.3 Zusammenfassung der $K_m$ - und $V_{max}$ -Werte	142
3.4.2.5 Bestimmung der Substratspezifität	142
3.4.2.6 Hemmung der enzymatischen Aktivität	143

3.4.3 Charakterisierung der kinetischen Parameter der Bildung des Farbstoffes	144
3.4.3.1 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten	145
3.4.3.2 Bestimmung des pH-Optimums	146
3.4.3.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums	147
3.4.3.4 Michaelis-Menten-Kinetik	147
3.5 Farbstoff und weitere Reaktionsprodukte	151
3.5.1 Identifizierung des Farbstoffes	151
3.5.1.1 Bestimmung des Farbstoffes mittels MS und HPLC-MS	152
3.5.2 Substanzen aus Farbstoffextrakten	154
3.6. Untersuchung der Extrakte aus <i>A. stipitatum</i>	161
3.6.1 Cysteinsulfoxide in <i>A. stipitatum</i>	161
3.6.2 Versuche zur Umsetzung des putativen Pyridinylcysteinsulfoxides mit Enzymrohextrakten	163
3.6.2.1 Ergebnisse der Umsetzung von <i>A. stipitatum</i> mit Enzymen direkt nach der Zugabe	164
3.6.2.2 Ergebnisse der Umsetzung von <i>A. stipitatum</i> mit Enzymen 24 Stunden nach der Zugabe	166
3.7 Steroide in <i>Allium</i> -Arten	170
3.8 Steroide in Arten der Gattung <i>Hoodia</i>	175
3.8.1 Untersuchungen an einigen Extrakten aus <i>Hoodia</i> , <i>Stapelia</i> sowie verwandten Arten	176
3.8.1.1 MS/MS Messungen	177
3.8.1.2 HPLC-MS Messungen der Extrakte	181
<b>4. Diskussion</b>	185
4.1 Isolierung des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides	185
4.1.1 Rolle des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides in der Bildung des roten Farbstoffes	185
4.1.2 Mögliche Biosynthese des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides	187
4.1.2.1 Biogenese der bekannten Cysteinsulfoxide	187
4.1.2.2 Biogenese des Pyrrolylcysteinsulfoxides	192
4.1.2.3 Porphobilinogen	192
4.1.2.4 Pyrrol-2-carboxylat	193

4.1.2.5 Mögliche Biosynthese	195
4.2 Proteinanalytik	197
4.2.1 Ausbeuten der Proteinrohextrakte	197
4.2.2 Proteingelanalytik	198
4.2.3 Proteinaufreinigung	205
4.2.3.1 Aufreinigung von Proteinfraktion A	205
4.2.3.2 Aufreinigung von Proteinfraktion B	206
4.2.4 Kinetische Parameter der Proteinfraktion B	211
4.2.4.1 Charakterisierung der Alliinase-ähnlichen Aktivität	212
4.2.4.2 Substratspezifität der Alliinase-ähnlichen Aktivität	214
4.2.4.3 Hemmung der Alliinase-ähnlichen Aktivität	216
4.2.4.4 Vergleich des neu isolierten Proteins mit Alliinase	219
4.2.4.5 Charakterisierung der Polyphenoloxidase-Aktivität	221
4.2.4.6 Bestimmung der Substratspezifität der Polyphenoloxidase-Aktivität	225
4.2.4.7 Hemmung der Polyphenoloxidase-Aktivität	227
4.2.4.8 Charakterisierung der kinetischen Parameter der Bildung des Farbstoffes	232
4.2.5. Zusammenfassung der Enzymcharakterisierung	235
4.3 Bildung des roten Farbstoffes	237
4.3.1. Identifizierung des Farbstoffes	237
4.3.2 Biosynthese des Farbstoffes	238
4.3.3 Funktion des Farbstoffes	245
4.4 weitere Substanzen in Farbstoffextrakten	247
4.4.1 Polymerisationsprodukte des Farbstoffes	247
4.4.2 Bildung von Polysulfiden	249
4.4.3 weitere Kondensationsprodukte	253
4.4.4 Zusammenfassung der Bestimmung weiterer Substanzen in Farbstoffextrakten	256
4.5 Inhaltsstoffe von <i>A. stipitatum</i>	257
4.5.1 Cysteinsulfoxide	258
4.5.2 Reaktionen mit Alliinase-ähnlichen Enzymen	258

4.6 Steroide in <i>Allium</i> Subgenus <i>Melanocrommyum</i> Arten	263
4.7 Untersuchungen der Steroidglykoside in Extrakten von <i>Hoodia</i> , <i>Stapelia</i> und verwandten Arten	265
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	269
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	273
<b>7. Anhang</b>	301

## ***Abkürzungsverzeichnis***

Abb.	Abbildung
Acc.No.	Accessions Nummer
amu	Atomic mass unit (Atommasseneinheit)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Arbitrary unit
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
ca.	Circa
CoA	Coenzym A
Con A	Concanavalin A
Cprot	Proteinkonzentration
cps	Counts per second
DC	Dünnschichtchromatographie
EC	Enzyme Code
EDTA	Dinatriummethyldiamintetraacetat Dihydrat
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	Et alia (und andere)
FPLC	fast performance liquid chromatography
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	high-performance liquid chromatography, Hochleistungs Flüssig- chromatographie
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung

## Abkürzungsverzeichnis

---

IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
M	Molarität, molar
m	Meter
min	Minute
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molecular weight, Molekulargewicht
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OPA	<i>Ortho</i> -Phthaldialdehyd
pH	Pondus hydrogenii

PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAX. Nr.	Taxonomische Nummer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v. Chr.	Vor Christus
VF	Verdünnungsfaktor
vgl.	Vergleiche
$V_{\max}$	Maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms
VT	Volumenteil
z	Ladungszahl
z.B.	Zum Beispiel
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Gattung *Allium*

Mit rund 750 Arten [Stearn 1992] zählt die Gattung *Allium* zu den größten im Pflanzenreich. Die Arten sind meist anspruchslose Pflanzen, die in ariden Gebieten beheimatet sind. Sie sind in der gesamten nördlichen Hemisphäre von den trockenen Subtropen bis zu den borealen Zonen verbreitet [Hanelt 1994]. Der Schwerpunkt der Verbreitung liegt in den gemäßigten und subtropischen Breiten Europas und Asiens vom Mittelmeer bis nach Zentralasien [Fritsch und Friesen 2002]. Ein zweites, kleineres Verbreitungsgebiet befindet sich in Nordamerika. Auf der Südhalbkugel konnte dagegen bisher nur eine Art nachgewiesen werden (*A. dregeanum* Kth). Einzelne *Allium*-Arten haben die verschiedensten ökologischen Nischen besetzt und konnten sich auch aus diesem Grund stark ausbreiten und differenzieren [Gregory et al. 1998]. Heute wird vermutet, dass sich die Ursprünge der Gattung *Allium* in Zentralasien befinden und diese sich von dort ausbreitete. *Allium*-Arten sind krautige Pflanzen, die unterirdisch verdickte Speicherorgane (Zwiebeln, Rhizome, Wurzeln) besitzen.

Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Klassifikationen für diese Gattung publiziert. Die derzeit aktuelle Fassung beruht auf einer Neuklassifizierung von Friesen et al. [2006]. Der phylogenetische Stammbaum ist in Abbildung 1.1 wiedergegeben.

Klasse	<i>Liliopsida</i>
Unterklasse	<i>Liliidae</i>
Superordnung	<i>Lillianaes</i>
Ordnung	<i>Amaryllidales</i>
Familie	<i>Alliaceae</i>
Unterfamilie	<i>Allioideae</i>
Stamm	<i>Allieae</i>
Gattung	<i>Allium</i>

Abb. 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der Gattung *Allium*



Des weiteren ist die große Gattung in Untergattungen unterteilt, die sich wiederum in zahlreiche Sektionen unterteilen. Der Subgenus *Melanocrommyum* gehört zu den größten Untergattungen.

## **1.2 Bedeutung der Gattung *Allium***

Einige Arten des Genus *Allium*, wie die Küchenzwiebel (*A. cepa* L.) und Knoblauch (*A. sativum* L.) haben fast weltweite Bedeutung als Gewürz und Gemüse. Andere Arten dagegen sind nur regional von Bedeutung. Dazu gehören etwa Lauch (*A. porrum* L.) und Schnittlauch (*A. schoenoprasum* L.) in Europa. Im östlichen Mittelmeerraum ist *A. ameloprasum* L. weit verbreitet als *kurrat* oder *tarée*. Als Gemüse oder Gewürz, aber auch als Heilpflanzen sind über 20 Spezies regional begrenzt von Bedeutung [Hanelt 2001, Fritsch und Friesen 2002]. Während Knoblauch und die Küchenzwiebel inzwischen relativ gut untersucht sind, und immer noch von zahlreichen Arbeitsgruppen weltweit in den verschiedensten Richtungen wissenschaftlich untersucht werden, sind die regional begrenzt vorkommenden Gattungen bisher gar nicht oder kaum untersucht worden und es ist nur sehr wenig über sie bekannt.

Bereits vor 3.500 Jahren wurde die Nutzung von Knoblauch und Küchenzwiebel im Papyrus Ebers dokumentiert. Das Papyrus Ebers ist eines der ältesten bekannten medizinischen Kompendien aus dem alten Ägypten [Sendl 1995]. Hier wurden bereits um 1500 v. Chr. 22 Knoblauch enthaltende Anwendungen gegen so unterschiedliche Erkrankungen wie Herzprobleme, Kopfschmerzen, Bisse, Würmer und Tumore beschrieben. Auch in der Ajurvedischen Medizin in Indien wurde Knoblauch als Bestandteil einer Lotion zum Reinigen von Wunden im „Bower Manuskript“ (ca. 450 v. Chr.) beschrieben. Im Europa des Mittelalters beschrieben Hildegard von Bingen oder Albertus Magnus die Wirkungen des Knoblauches.

Zur pharmazeutischen Wirksamkeit des Knoblauches ist besonders die Wirkung auf das Herz-Kreislauf System und die anti-atherosklerotische Wirkung hervorzuheben [Koch und Lawson 1996, Keusgen 2002b]. Zudem verfügt er über lipidsenkende Wirkung und hemmt die Thrombozyten-Aggregation, während die blutdrucksenkende Wirkung noch diskutiert wird. Die Senkung des Blutfettspiegels konnte auf die Wirkung der schwefelhaltigen Inhaltsstoffe auf das Enzym Acetyl CoA-Carboxylase in der Cholesterin Biosynthese zurückgeführt werden [Gebhardt 1993, Gebhardt und Beck 1996]. Die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und damit die Hemmung der Blutgerinnung wird durch Diallyldisulfide bewirkt [Apitz-Castro et al. 1983, 1986].

Im allgemeinen können die positiven gesundheitlichen Wirkungen des Knoblauchs zumeist auf Allicin sowie auf dessen Abbauprodukte zurückgeführt werden. So wirkt Allicin antibiotisch, fungizid, insektizid und antiparasitär [Reuter 1995, Koch und Lawson 1996].

Die antibiotische Wirkung der Küchenzwiebel kann vermutlich neben verschiedenen schwefelhaltigen Inhaltsstoffen auch auf verschiedene Proteine, Phenole und Saponine zurückgeführt werden. Für die anti-asthmatische Aktivität werden vor allem Thiosulfinate und Cypaene verantwortlich gemacht [Dorsch 1996], wobei die Cypaene zusätzlich entzündungshemmende Eigenschaften zeigen [Wagner et al. 1990].

In den letzten Jahren wurde auch immer mehr die tumorprotektive Wirkung der *Allium*-Arten diskutiert. Eine Wirkung auf Phase-II-Enzyme konnte für Dialkylsulfide aus Knoblauch und Küchenzwiebel nachgewiesen werden [Siess et al. 1997, Guyonnet et al. 1999].

Knoblauchpräparate haben heute einen hohen Stellenwert als Phytopharmaka. Im Jahr 1995 hatten Knoblauchpräparate einen Anteil von 10% am gesamten Phytopharmaka Markt, für den deutschen Markt lag der Anteil in derselben Größenordnung [Rawls 1995]. Seit 1998 enthält das europäische Arzneibuch eine Monographie zu Knoblauch.

### **1.3 Inhaltsstoffe der *Allium*-Arten**

Wichtige Inhaltsstoffe der *Allium*-Arten sind neben den ubiquitären Cysteinsulfoxiden und der Alliinase,  $\gamma$ -Glutamylpeptide [Mütsch-Eckner et al. 1992], Polyfructane [Koch und Hahn 1988], Flavanoide, Saponine und Lectine [Smeets et al. 1997a,b,c] sowie nennenswerte Mengen Selen [Block 1992].

Von besonderer Bedeutung für die Gattung *Allium* sind die schwefelhaltigen Verbindungen. Diese und ihre Abbau- und Umwandlungsprodukte sind verantwortlich für das spezifische Aroma der einzelnen Arten. Außerdem werden verschiedene gesundheitsfördernde Eigenschaften auf Schwefelverbindungen zurückgeführt. Die Schwefelinhaltsstoffe machen zwischen 1 und 5% der Trockenmasse der Zwiebeln aus [Block 1992, Koch und Lawson 1996].

### 1.3.1. Cysteinsulfoxide

Die wichtigsten schwefelhaltigen Inhaltsstoffe sind die Cysteinsulfoxide, die sich von der Aminosäure Cystein ableiten. Diese nicht-proteinogene Aminosäuren bestehen aus Alk(en)ylketten, die über einen oxidierten Schwefel mit einem Aminosäurerest verbunden sind. Die vier am häufigsten vorkommenden Cysteinsulfoxide sind (+)-S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid (Methiin), (+)-S-Propyl-L-Cysteinsulfoxid (Propiin), (+)-S-(2-Propenyl)-L-Cysteinsulfoxid (Alliin) und (+)-S-(1-Propenyl)-L-Cysteinsulfoxid (Isoalliin) (Abb. 1.2) [Fritsch und Keusgen 2006, Keusgen et al. 2002a].

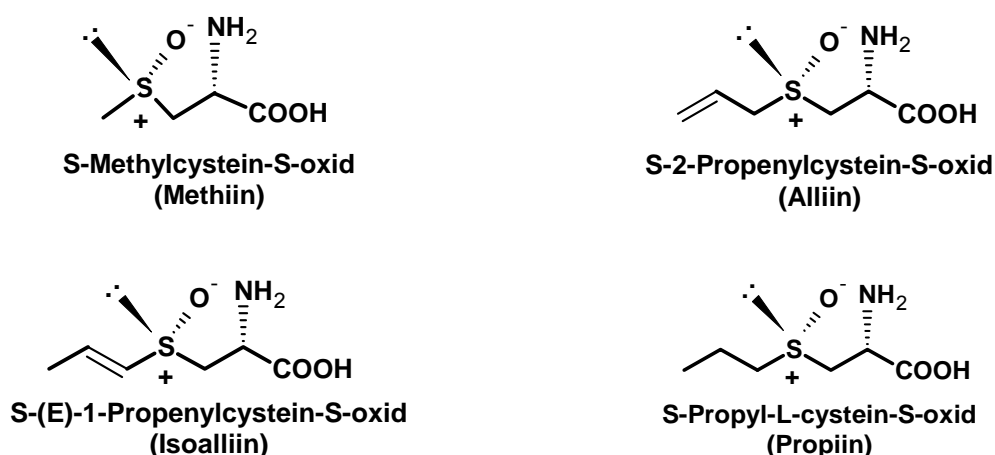


Abb. 1.2: Struktur der vier wichtigsten Cysteinsulfoxide: Methiin, Alliin, Isoalliin und Propiin

Bisher konnten in der Natur nur die (+)-S-Alk(en)yl-L-Cysteinsulfoxide nachgewiesen werden, nicht dagegen die analog zu erwartenden Diastereomere [Koch und Lawson 1996]. Das Vorkommen und die Zusammensetzung der Cysteinsulfoxide in den einzelnen Arten bestimmt deren sensorische Eigenschaften. Für das typische Aroma von Knoblauch sind die Sulfoxide Alliin und Methiin verantwortlich, in Zwiebeln sind dagegen hauptsächlich Isoalliin und Methiin enthalten. Die Konzentration von Alliin im Knoblauch ist 10fach höher als die Konzentration der anderen Cysteinsulfoxide.

1948 gelang Stoll und Seebeck [1948] erstmals die Isolierung des Alliins. Zudem konnten die an der Aminogruppe substituierten  $\gamma$ -Glutamylderivate nachgewiesen werden, deren Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Vermutlich stellen sie eine Speicherform der Cysteinsulfoxide dar, spielen aber auch eine Rolle bei der Biosynthese. Der  $\gamma$ -Glutamyrest kann durch ein Enzym, die  $\gamma$ -Glutamytransferase

abgespalten werden [Koch und Lawson 1996]. Daneben sind auch die entsprechenden  $\gamma$ -Glutamylpeptide enthalten.

Neben Methiin, Alliin, Isoalliin und Propiin konnten auch andere Cysteinsulfoxide in Spuren nachgewiesen werden. So gelang Kubec et al. [2000] die Detektion von Ethiin ((+)-S-Ethyl-L-Cysteinsulfoxid) in mehreren *Allium* Proben in sehr niedriger Konzentration. 2002 berichteten Kubec et al. dann von dem Nachweis von Butiin (S-n-Butylcysteinsulfoxide) sowie n-Butylhaltigen Thiosulfinaten in *A. sicculum* Ucria. Die Existenz verschiedener anderer wie Pentanyl- oder Isopropyl-haltigen Cysteinsulfoxiden wird diskutiert, konnte aber noch nicht bewiesen werden.

### 1.3.2 Alliinase

Ein besonders wichtiges Enzym der Gattung *Allium* ist die Alliinase. Diese Alliin-Lyase (EC 4.4.1.4) gehört zur Familie der CS-Lyasen [Randle und Lancaster 2000]. Alliinase wurde zuerst von Stoll und Seebeck aus *Allium sativum* isoliert [1949]. Vermutlich ist sie in allen *Allium*-Arten enthalten [Lancaster et al. 2000]. Alliinase aus Knoblauch ist wohl das am besten untersuchte Enzym der Gattung *Allium*. Es handelt sich um ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 103 kDa [Kuettner et al. 2002]. Jede Untereinheit besteht aus 448 Aminosäuren. An jede ist ein Molekül Pyridoxal-5'-Phosphat gebunden. Alliinasen anderer *Allium*-Arten bestehen ebenfalls aus zwei Untereinheiten, die sich allerdings voneinander unterscheiden können [Sendl 1995, Landshuter et al. 1994]. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 7 und 7,5 und das Temperaturoptimum oberhalb von 36°C. Die höchste Substratspezifität besteht gegen Alliin und Isoalliin [Krest et al. 2000a/b Nock und Mazelis 1986, Jansen et al. 1989a/b, Rabinkov et al. 1994].

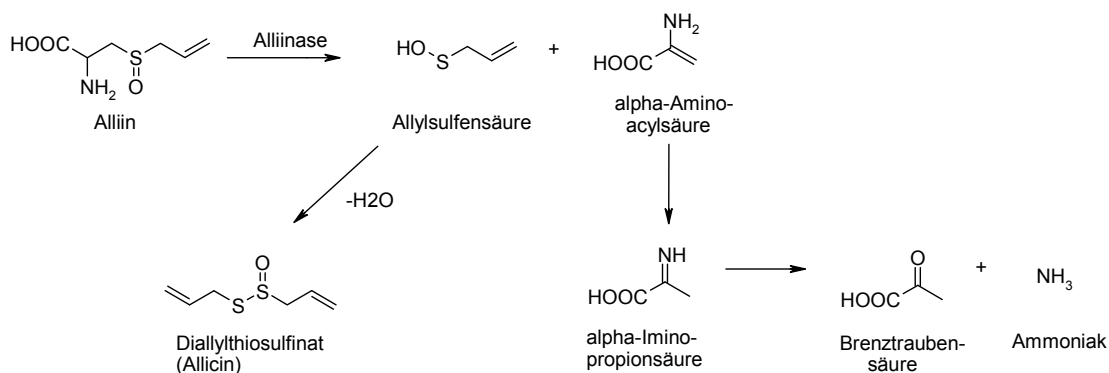


Abb. 1.3: Reaktion der Alliinase mit Alliin

Die Entstehung des charakteristischen Aromas durch die Umsetzung der Cysteinsulfoxide durch Alliinase wurde bereits in den 1940er Jahren von Cavalito und Bailey [1944] und später von Stoll und Seebeck [1949, 1951], Virtanen et al. [1961] und Schwimmer [1968] diskutiert. Die Lokalisierung der Alliinase in der Vakuole wurde 1981 von Lancaster et al. bewiesen, während sich die Cysteinsulfoxide im Cytoplasma und auch im rauen endoplasmatischen Reticulum befinden [Edwards et al. 1994]. Bei Beschädigung der Zellsubstanz, z.B. durch Fraßfeinde, Pilze, Bakterien oder durch anschneiden der Zwiebel, kommen die Cysteinsulfoxide mit dem Enzym Alliinase in Kontakt.

Alliinase ist ein Pyridoxal-5'-Phosphat abhängiges Enzym. Dieser Cofaktor ist direkt an der katalytischen Umsetzung der Cysteinsulfoxide beteiligt. Hierbei bildet sich zunächst eine Schiff'sche Base aus dem geruchslosen Cysteinsulfoxid mit dem Pyridoxal-5'-Phosphat. Diese ist in der katalytischen Tasche des Enzyms reversibel gebunden. Dort erfolgt die  $\beta$ -Eliminierung, die die C-S-Bindung spaltet [Breu 1996]. Bei der Reaktion entstehen neben Alk(en)ylsulfensäure auch Ammoniak und Pyruvat. Die Alk(en)ylsulfensäuren reagieren weiter zu Thiosulfinaten. Dies sind die primären Aromakomponenten, die für den typischen Geruch verantwortlich sind (Abb. 1.3).

Cysteinsulfoxide, die an  $\gamma$ -Glutamylpeptide substituiert sind, können nicht von der Alliinase abgebaut werden und spielen damit auch keine Rolle bei der Aromastoffentwicklung [Whitaker 1976].

Eine Alliinaseaktivität wurde bisher nicht nur in der Gattung *Allium* nachgewiesen, sondern auch in verschiedenen anderen Arten. Dazu gehören sowohl relativ nah verwandte Arten wie *Ipheion*, *Tulbaghia* [Jacobsen et al. 1968] und *Leucocoryne* [Lancaster et al. 2000] als auch entferntere Arten wie *Alliaria petiolata*, die aufgrund ihres Geruches auch Knoblauchrauke genannt wird [Keusgen 1999], und anderen Vertretern der Familie *Brassicaceae* [Hall und Smith 1983, Ho und Mazelis 1993, Ramirez und Whitaker 1998]. Zudem wurden Alkylcysteinylasen in dem Bakterium *Pseudomonas putida* und im Shiitake Pilz *Lentinus edodes* nachgewiesen [Kamitani et al. 1990, Iwami und Yasumoto 1980].

### 1.3.3 primäre und sekundäre Aromakomponenten

Die instabilen Alk(en)ylsulfensäuren, die bei der Reaktion der Cysteinsulfoxide mit Alliinase entstehen, reagieren sofort weiter zu den primären Aromakomponenten wie Thiosulfinaten oder dem Tränenfaktor. Im Falle von Alliin kondensiert die entstehende Allylsulfensäure aufgrund ihrer hohen Instabilität unter Abspaltung von Wasser zu Allicin (Abb. 1.4). Dieses ist allerdings ebenfalls instabil und reagiert weiter in verschiedenen Abbaureaktionen zu Allylsulfid, Allyldisulfid und Allyltrisulfid unter Entwicklung von Schwefeldioxid [Brodnitz et al. 1971]. Auch einige andere symmetrischer und asymmetrisch substituierter Mono-, Di- und Trisulfide mit Propyl-, Methyl- und Allylgruppen konnten isoliert werden [Oaks et al. 1964]. In weiteren Reaktionen entstehen eine Vielzahl anderer Verbindungen, wie Ajoene oder Vinylthiine [Winkler et al. 1991]. Allicin ist damit nur typisch für das Aroma von frisch geschnittenem Knoblauch.

Aus Isoalliin entsteht 1-Propenylsulfensäure, die spontan zum Tränenfaktor (Propanalsulfoxid) reagiert (Abb. 1.4) [Virtanen 1965]. Hieraus entstehen in weiteren Abbaureaktionen zyklische Disulfidverbindungen (Zwiebelane) und Sulfinylsulfide (Cepaene) [Block 1992]. Innerhalb weniger Stunden bei Raumtemperatur sind die Thiosulfinate komplett umgesetzt.

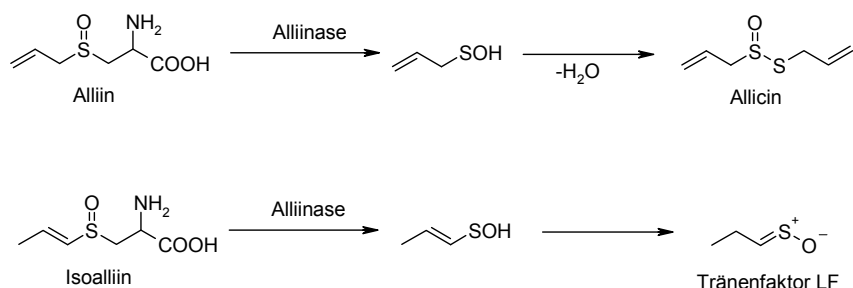


Abb. 1.4: Bildung von Allicin und dem Tränenfaktor aus Knoblauch und Zwiebeln

Interessanterweise konnten bisher keine bis- $\alpha,\beta$  ungesättigten Thiosulfinate isoliert werden. Nachgewiesen werden konnten einige mono- $\alpha,\beta$  ungesättigte Thiosulfinate sowie bis- $\beta,\gamma$  ungesättigte, wie z.B. Allicin aus Knoblauch. Der Grund hierfür ist die schnelle Umwandlung der bis- $\alpha,\beta$ -ungesättigten Verbindungen unter Bildung von Zwiebelanen (Abb. 1.5) [Block 1992].

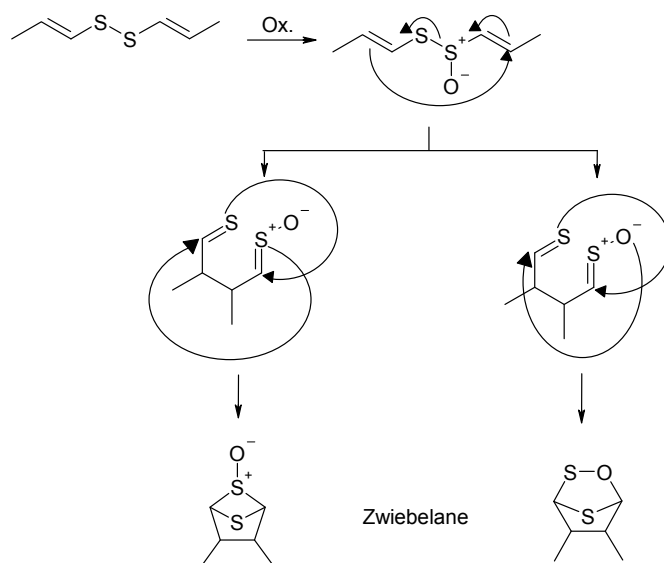


Abb. 1.5: Biosynthese der Ziebelane

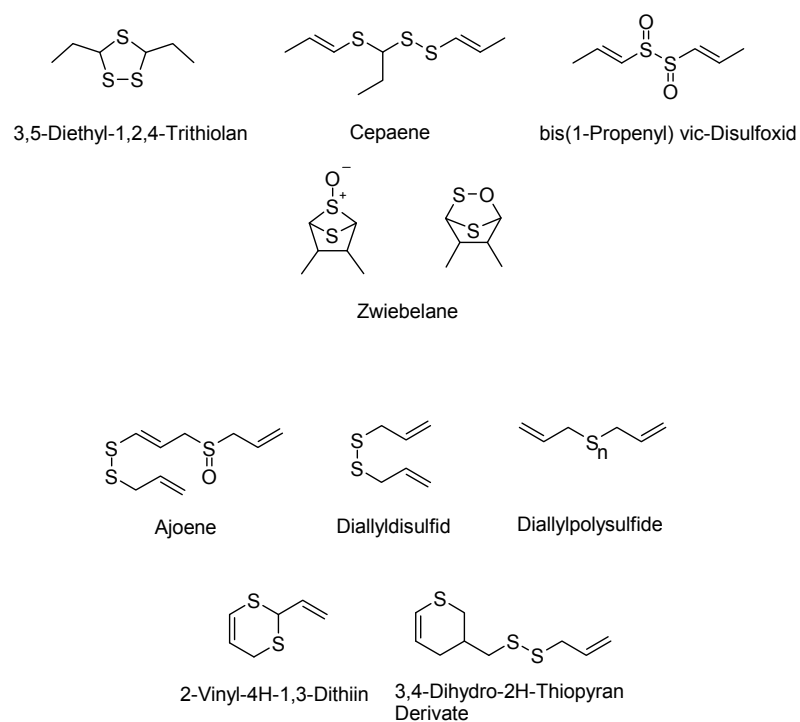


Abb. 1.6: Sekundäre Aromakomponenten aus Zwiebeln (Cypaene, Ziebelane, 3,5-Diethyl-1,2,4-Trithiolan, bis(1-Propenyl)vic-Disulfoxid) und Knoblauch (Ajoene, Diallyldisulfid, Diallylpolsulfide, 2-Vinyl-4H-1,3-Dithiin, 3,4-Dihydro-2H-Thiopyran Derivate)

In Abbildung 1.6 sind einige der für *A. cepa* und *A. sativum* typischen sekundären Aromakomponenten wiedergegeben. Es entstehen eine Vielzahl von Produkten der unterschiedlichsten Strukturen. Obwohl die Reaktionen und die Produkte schon sehr lange intensiv untersucht werden, können immer wieder neue Substanzen isoliert werden. Die Aromabildung ist also ein sehr komplexer Vorgang. Das typische Aroma verschiedener Extrakte und Zubereitungsformen ist von einer Vielzahl einzelner Substanzen abhängig [Block 1992].

### 1.3.4 $\gamma$ -Glutamylpeptide

Das Hauptpeptid ist das  $\gamma$ -Glutamyl-trans-(+)-S-(1-Propenyl)-Cysteinsulfoxid, das in Mengen von ca. 130 mg pro 100g Frischgewicht enthalten ist [Carson 1987]. Die Funktion der Peptide in der Pflanze konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Vermutlich dienen sie der Speicherung von Schwefel und Stickstoff. Diese Reserven werden dann für das Keimen oder Sprießen benötigt. Vermutlich werden die vorliegenden Peptide in zerstörtem Zellgewebe nicht in aromawirksame Komponenten umgewandelt [Lancaster und Shaw 1991]. Möglicherweise tragen sie aber zum Aroma beim Kochen bei, da sie hier thermisch abgebaut werden können [Block 1992]. Als Beispiel für die Struktur der verschiedenen  $\gamma$ -Glutamyle ist in Abbildung 1.7  $\gamma$ -Glutamyl-S-2-Propenylcystein wiedergegeben.

Glutathion kann in den Chloroplasten und im Cytoplasma nachgewiesen werden,  $\gamma$ -Glutamylpeptide im Cytoplasma und  $\gamma$ -Glutamylcystein in den Chloroplasten.

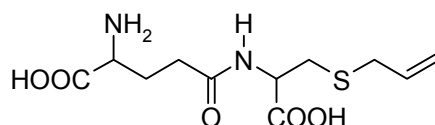


Abb. 1.7:  $\gamma$ -Glutamyl-S-2-Propenylcystein

### 1.3.5 Andere Enzyme

Die Cysteinsulfoxide werden in der Pflanze als  $\gamma$ -Glutamylpeptide gespeichert. Für die Freisetzung der Sulfoxide aus den Peptiden ist die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase verantwortlich. Diese transferiert die  $\gamma$ -Glutamylgruppe der Peptide entweder auf andere Peptide oder auf Aminosäuren [Jones et al. 2004].



Ein weiteres für das Aroma der Gattung verantwortliches Enzym ist die Tränenfaktor-Synthase (Lachrymatory Factor (LF-) Synthase). Diese katalysiert die Umsetzung zu dem sogenannten Tränenfaktor (Abb. 1.4). Das Enzym besteht aus 169 Aminosäuren. Als Substrat wird mit einer hohen Spezifität Isoalliin akzeptiert [Imai et al. 2002]. Vor der Isolierung dieses Enzyms wurde lange angenommen, dass die Bildung des Tränenfaktors spontan nach der Umsetzung durch Alliinase zu den Sulfensäuren stattfindet. Der Tränenfaktor ist typisch für das Aroma der Zwiebeln und stimuliert die Bildung von Tränen beim Zerschneiden der Zwiebel.

Erst vor kurzem gelang Eady et al. [2008] das Gen der LF-Synthase stumm zu schalten (inaktivieren) (gene silencing). Hierdurch entstanden aromatisch veränderte Zwiebeln, die sehr viel milder sind als die herkömmlichen. Ihr Aroma ähnelt dem von gekochten Zwiebeln. Das Ausschalten der LF-Synthase führte zur Bildung von 1-Propenylthiosulfinaten, die nur indirekt nachgewiesen werden konnten. In weiteren Reaktionen entstehen unter anderem Zwiebelane und Disulfide. Die Veränderung der Zusammensetzung der aromawirksamen Komponenten zeigte die komplexe Natur der Biosynthese der Schwefelmetabolite und die starke Abhängigkeit der einzelnen Reaktionen untereinander. Große Bedeutung für das Aroma haben neben den beiden Enzymen Alliinase und LF-Synthase und ihren Reaktionen das Verhältnis der Cysteinsulfoxide untereinander.

### **1.3.6 Steroide in *Allium*-Arten**

Steroidsaponine sind in Arten der *Liliaceae* und *Alliaceae* Familien sehr weit verbreitet, vor allem Spirostanol- und Furostanol-Derivate (Abb. 1.8) [Inoue et al. 1995].

Knoblauch enthält 0,3-1,1% Saponine bezogen auf das Trockengewicht in den Speicherorganen. Bisher nachgewiesen werden konnten Steroidsaponine, Furostanolglykoside und Spirostanolglykoside. Die Wirkungen der Saponine im Knoblauch sind vielfältig. Sie umfassen u.a. antifungizide, zytotoxische und Cholesterin senkende Wirkungen [Matsuura 2001]. Des weiteren konnten Steroidsaponine vom Furostanol- und Spirostanoltyp auch in der Küchenzwiebel nachgewiesen werden [Koch und Lawson 1996, Breu 1996].

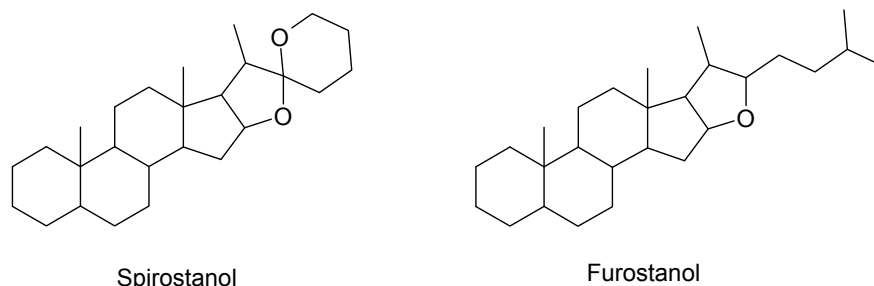


Abb. 1.8: Grundgerüste der Aglykone der Spirostanol- und Furostanolsterioide

### 1.3.7 Weitere Inhaltsstoffe

Der Wassergehalt des Knoblauchs beträgt nur 65%, der Küchenzwiebel 88-95%. Der Anteil an Kohlenhydraten beträgt 77% der Trockenmasse des Knoblauchs [Koch und Lawon 1996]. Als Speicherstoff bilden sowohl Küchenzwiebel als auch Knoblauch nicht Stärke sondern Fruktane. Diese ähneln dem Inulin, das auch in verschiedenen *Asteraceae*-Arten als Speicherstoff enthalten ist. Der Polymerisationsgrad liegt hierbei zwischen 2 bis 60 Zuckereinheiten im Knoblauch [Koch und Lawson 1996] und 10 bis 15 Zuckereinheiten in der Zwiebel [Suzuki und Cutcliffe 1989, Ernst et al. 1998]. Auch Glukose kann hier als Baustein auftreten. Die Zuckermomere werden zunächst in den Blättern bei der Photosynthese gebildet und dann als Saccharose in den Leitbündeln weiter transportiert. Aus Saccharose können dann die Fruktane durch Kondensation weiterer Fruktosemoleküle gebildet werden. Der Kohlenhydratanteil hat aus ernährungsphysiologischer Sicht einen geringen Effekt, spielt jedoch bei der Aromabildung eine große Rolle und ist natürlich für die Süße einiger Arten verantwortlich. Die niedermolekularen Fruktane könnten auch eine Rolle bei der Osmoregulation spielen [Darbyshire und Henry 1981].

In der Gattung *Allium* kommt hauptsächlich das Flavanoid Quercetin vor. Dieses macht in roten Zwiebeln bis zu 2,1% des Trockengewichtes aus [Patil et al. 1995a/b]. Flavanoide sind Polyphenole, die eine besondere Rolle als antioxidative Substanzen spielen.

Des weiteren enthalten *Allium*-Arten Fruchtsäuren wie Apfel- und Zitronensäure, Vitamine, wie B1, B2, B6, Biotin, Nikotin-, Fol-, Pantothen- und Ascorbinsäure sowie Selen [Breu 1996, Koch und Lawson 1996].

### 1.4 Arten des Subgenus *Melanocrommyum*

Der Subgenus *Melanocrommyum* gehört zu den größten Untergattungen des Genus *Allium*. Etwa 200 Spezies dieser Untergattung sind weltweit bekannt. Die meisten dieser Arten stammen aus Südwest- und Zentralasien. Dort sind diese Arten weit verbreitet und bekannt und werden für vielfältige Zwecke genutzt. In den westlichen Ländern dagegen sind sie hauptsächlich als Zierpflanzen bekannt, als sogenannte Paukenschlägerlauche. Vermutlich liegen in dieser fehlenden Bekanntheit als pharmazeutische Pflanzen und in den geopolitischen Gegebenheiten der Heimatländer die geringen wissenschaftlichen Kenntnisse über diese Arten begründet. In Zentralasien werden ihre Vertreter für die unterschiedlichsten Zwecke verwendet. So werden die jungen Blätter von *A. motor* Kamelin et Levichev als Tonikum nach langen Wintern eingesetzt. Sie werden als *moj-motor* bezeichnet, wobei motor Gesundheit bedeutet. *A. karataviense* Regel wird verwendet, um die Wundheilung zu beschleunigen. Die Blätter von *A. rosenorum* R. M. Fritsch sind dagegen in Tadschikistan sehr beliebt als Einlage für Suppen (*siohalaf* oder *siekhaf*) [Kochkareva und Chukavina 1985, Fritsch 1990, Keusgen et al. 2006].

Die meisten dieser Spezies haben ein sehr mildes Aroma und weisen einen geringen Gehalt an den vier Hauptcysteinsulfoxiden auf. Einige Arten des Subgenus *Melanocrommyum* zeichnen sich durch eine rote Verfärbung bei Verletzung der Zellstruktur aus. Berichte aus den Ursprungsländern dieser Pflanzen lassen vermuten, dass dieser Farbstoff sogar zum Färben von Seide verwendet wurde. Er bildet sich sehr schnell nach der Verletzung des Zellgewebes. Die Struktur des Farbstoffes konnte erst vor kurzem in *A. giganteum* Regel aufgeklärt werden. Es handelt sich um ein Dithiodipyrrol (Abb.1.9) [Jedelská 2007].

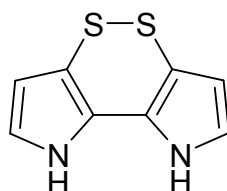


Abb. 1.9: Aus *A. giganteum* isoliertes Dithiodipyrrol

Auf der anderen Seite gibt es auch Vertreter des Subgenus *Melanocrommyum*, die keinen roten Farbstoff bei einer Verletzung des Zellgewebes ausbilden. Hierzu gehört *Allium stipitatum* Regel. Die Zwiebeln dieser Art haben ein sehr intensives Aroma, weshalb sie nicht unverarbeitet genossen werden. In Tadschikistan und Russland werden sie allerdings, eingelegt als *anzur*, als beliebte Delikatesse geschätzt. Auch ein Verzehr der trockenen Zwiebeln in Joghurt (*mu sir*) ist sehr beliebt, besonders im Iran. Der Joghurt neutralisiert das scharfe, stechende Aroma.

### **1.5 Steroidglykoside in Pflanzen**

Die Gruppe der Steroidglykoside oder Saponine ist sehr divers. Ihren Namen leiten diese Substanzen von dem lateinischen Wort *sapo* ab, das Seife bedeutet. Diese Namensgebung verweist auf die oberflächenaktiven, seifenähnlichen Eigenschaften der Saponine. Diese ergeben sich durch die Struktur der Moleküle. Das unpolare Steroidaglykon ist mit polaren Glykosidketten verbunden. Diese Glykoketten bestehen aus bis zu acht Monosacchariden oder Uronsäuren. Saponine mit einer Kohlenhydratkette bezeichnet man als Monodesmoside, mit zwei unabhängigen Ketten als Bidesmoside [Belitz 2008].

Saponine konnten in über 100 Pflanzenfamilien nachgewiesen werden, besonders in Monokotyledonen wie *Agavaceae* oder *Liliaceae* und Dikotyledonen (Leguminosen, *Caryophyllaceae*). Hierbei kommen in den Monokotyledonen vor allem Steroidsaponine, in den Dikotyledonen Triterpensaponine vor [Sparg et al. 2004]. In Nahrungsmitteln sind vor allem die saponinreichen Leguminosen von Bedeutung. Auch die Steroidsaponine aus *Allium*-Arten sind gut untersucht und weisen einige pharmazeutische Wirkungen auf (vgl. Kapitel 1.3.6 und 1.5.1). In den letzten Jahren hat in Bezug auf Steroidglykoside allerdings eine andere Pflanzengattung rapide an Interesse gewonnen. Seit 1998 die hungerunterdrückende Wirkung eines Oxypregnansteroids bekannt wurde [van Heerden et al. 1999], ist die vorher weitgehend unbeachtete Gattung *Hoodia* ein wichtiger Bestandteil der Steroidforschung geworden.

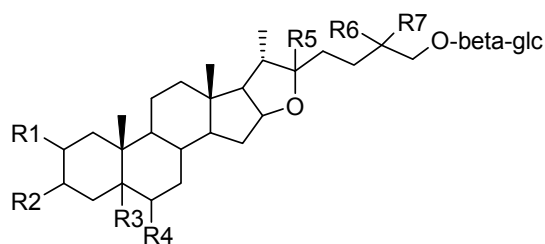
Die wachsende Bedeutung der Gattung *Hoodia* und seiner Inhaltsstoffe lässt sich auch an der steigenden Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema ableiten. Bis in das Jahr 2000 wurde *Hoodia gordonii* in keiner wissenschaftlichen Publikation erwähnt, von 2001 bis 2005 in 6 und von 2006 bis 2008 in 17 Publikationen. Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die Zahl der Patente

betrachtet, in denen diese Pflanze zitiert wurde. Bis 2000 waren es 3 Patente, zwischen 2001 und 2006 82 und seit 2006 180 Patente [van Wyk 2008a/b].

#### **1.5.1 Steroidsaponine des Subgenus *Melanocrommyum***

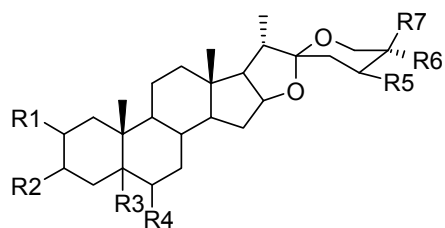
Da die *Melanocrommyum* Arten bisher kaum wissenschaftlich untersucht wurden, ist sehr wenig bekannt über deren Zusammensetzung und Inhaltsstoffe. Auch die Substanzen, die an den positiven gesundheitlichen Auswirkungen beteiligt sind, sind weitgehend unbekannt. Untersucht wurden bisher nur die Steroidsaponine einzelner Arten. Die Grundgerüste dieser Verbindungen sind mit Beispielen in Abbildung 1.10 wiedergegeben.

So zeigen Saponine, die aus *A. chinense* und *A. giganteum* isoliert werden konnten, Wirkung auf Enzyme des ATP- und cAMP-Stoffwechsels [Kuroda et al. 1995, Mimaki et al. 1994b]. cAMP dient als Botenstoff im menschlichen Organismus, während ATP eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel spielt. Steroidsaponine aus *A. jesdianum* Boiss. et Buhse und *A. karataviense* Regel zeigen außerdem zytostatische und zytotoxische Wirkungen gegen verschiedene tumoröse Zelllinien [Mimaki et al. 1994a,b]. Ähnliche Substanzen aus *A. macleanii* J. G. Baker und *A. senescens* L. zeigten neben der erwünschten tumorpräventiven Wirkung auch eine unerwünschte zytotoxische Aktivität gegen gesunde Zellen [Inoue et al. 1995].



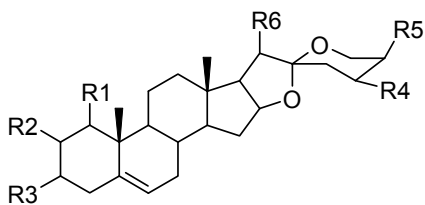
Beispiel: **Elburzensoid A**

R1 -OH  
R2 -O-beta-Glukose  
R3 -OH  
R4 -OH  
R5 -OH  
R6 -CH<sub>3</sub>  
R7 -H



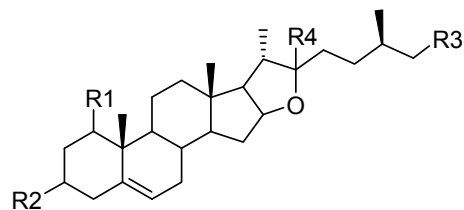
Beispiel: **Gitogenin / Diosgenin**

R1 -OH / H  
R2 -OH  
R3 -H  
R4 -H  
R5 -H  
R6 CH<sub>3</sub>  
R7 H



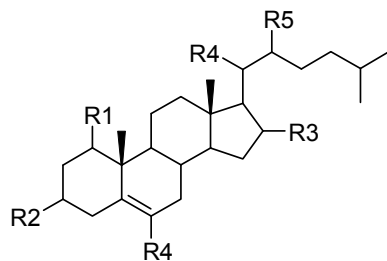
Beispiel: **Cepagenin**

R1 -OH  
R2 -H  
R3 -OH  
R4 -OH  
R5 -CH<sub>3</sub>  
R6 -CH<sub>3</sub>



Beispiel: **Tropeoside A / B**

R1 -O-Gal / -O-Xyl  
R2 -OH  
R3 -O-Rha  
R4 -OH



Beispiel: **Steroid aus A. jesdianum1**

R1 -O-beta-Glc  
R2 -OH  
R3 -O-beta-Glc  
R4 -CH<sub>3</sub>  
R5 -OH

Abb. 1.10: Grundgerüste der in *Melanocrommyum* Arten nachgewiesenen Steroidsaponine

### 1.5.2 Hoodia-Arten und Steroidsaponine

Die Gattung *Hoodia* umfasst 13 Spezies (*H. alstonii*, *H. currorii*, *H. dregei*, *H. flava*, *H. gordonii*, *H. juttae*, *H. mossamedensis*, *H. officinalis*, *H. parviflora*, *H. pedicellata*, *H. pilifera*, *H. ruschii*, and *H. triebneri*), die endemisch in den trockeneren, westlichen Gebieten Afrikas, von Südafrika bis Angola vorkommen. Besonders verbreitet sind sie in Südafrika, Namibia und Botswana. Durch kleine, weit verstreute Populationen sind sie sehr anfällig gegen Übererntung. Die Pflanzen haben ein Kaktus-ähnliches Aussehen und werden in den Medien auch oft als solcher beschrieben, gehören allerdings zu der Familie *Asclepiadaceae*, den Wolfsmilchgewächsen und somit zu den Sukkulenten (Abb. 1.11). *H. pilifera* wurde früher fälschlich als *Trichocaulon piliferum* (Linne' fil) N. E. Brown klassifiziert. 1992 wurde eine neue Klassifizierung vorgenommen und die Arten in der Gattung *Hoodia* zusammengefasst, zu der auch *Hoodia gordonii* gehört. Diese war früher bekannt als *Stapelia gordonii*.

Familie:	<i>Apocynaceae</i> (Wolfsmilchgewächse)
Unterfamilie	<i>Asclepiadoideae</i> (Seidenpflanzengewächse)
Stamm	<i>Ceropegieae</i>
Unterstamm	<i>Stapeliinae</i>
Gattung	<i>Hoodia</i>

Abb. 1.11 Phylogenetischer Stammbaum von *Hoodia gordonii*

Der Genus *Hoodia* wurde taxonomisch von White und Sloane [1937] und später von Bruyns [1993] beschrieben. Die Pflanzen sind sehr resistent gegen extreme Wetterbedingungen, wie extreme Hitze und niedrige Temperaturen im Wechsel und trockene, sandige und steinige Böden. Die Blüten dieser Gattung werden bis zu 75 mm groß und riechen nach verrottendem Fleisch, weswegen die Pflanzen auch als Aas-Blumen bezeichnet werden. Zu den Aasblumen werden außerdem u.a. Vertreter der Gattungen *Stapelia* oder *Amorphophallus* gerechnet. Der strenge, unangenehme Geruch diente vermutlich in der Evolution der Anlockung von Fliegen und anderen Insekten, die auf den Blüten ihre Eier ablegen und diese dabei bestäuben.

Die Khoy San Buschmänner leben in der Kalahari Wüste im südlichen Afrika. Traditionell isst dieses Volk die oberirdischen Teile von *Hoodia*-Arten, um auf den

langen Jagden ihren Hunger und Durst zu unterdrücken. Daneben wurden die Pflanzen gegen abdominale Krämpfe, Verdauungsstörungen, Hämorrhoiden, Tuberkulose, Bluthochdruck und als Antidiabetikum verwendet. Aber auch andere Völker haben diese Spezies genutzt. Die Haioms im nördlichen Namibia nutzen den Pflanzensaft, um allergische Reaktionen an den Augen zu behandeln. Gegen starke Bauchschmerzen werden Stücke der Pflanze in Wasser gekocht und der Extrakt getrunken. Auch die Anikhwe im nördlichen Botswana und die Khomani im Nordwesten von Südafrika verwenden traditionell *Hoodia*, um weniger zu essen. Die hungerunterdrückende Wirkung von *Hoodia gordonii* wurde zum ersten Mal von Marloth [1932] beschrieben.

*H. pilifera* wird von den Ureinwohnern *ghaap*, *guaap* oder *ngaapIt* genannt [Marloth 1932]. Es hat einen faden, aber kühlen und wässrigen Geschmack [Pappe 1862]. Die Pflanze wird sowohl roh als auch in Zucker eingelegt genossen [White und Sloane 1937]. *Hoodia gordonii* (Masson) Sweet ex Decne. dagegen ist größer und hat härtere Stacheln. Diese Spezies dient seltener als Nahrungsmittel und wird daher als 'muishondghaap' oder 'jakkalsghaap' bezeichnet, also als nur für Tiere geeignet [White und Sloane 1937]. *Hoodia gordonii* hat einen bitteren, lang anhaltenden Geschmack [Bruyns 1993].

Anfang der sechziger Jahre begann der CSIR (South African Council for Scientific and Industrial Research) eine groß angelegte Studie zum Nährwert und möglichen toxischen Langzeitwirkungen von mehr als 1000 südafrikanischen Pflanzenarten. In einer Untersuchung von 1983 zu *Hoodia pilifera* konnte in Tierexperimenten eine hungerunterdrückende Wirkung der Extrakte an Ratten nachgewiesen werden. 1995 gelang die Isolierung einiger Steroidglykoside aus verschiedenen *Hoodia*-Arten, wie *Hoodia gordonii*, *Hoodia lugardii* und *Hoodia currouri*. In dem Patent aus diesem Jahr wird das aktive Steroidglykosid P57 beschrieben (Abb. 1.12) [van Heerden et al. 1999, 2007]. Dessen Wirksamkeit wurde später von anderen Studien bestätigt [Tulp et al. 2001].



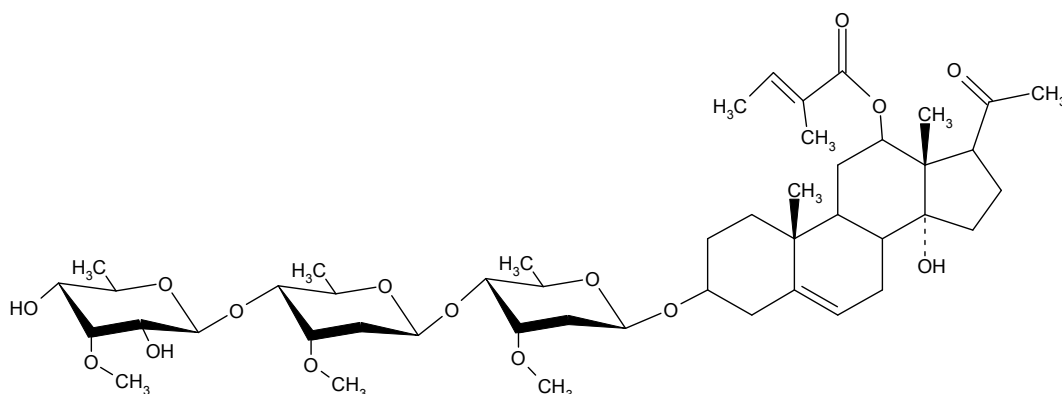


Abb. 1.12: Struktur des hungerunterdrückenden Steroidglykosides P57 aus *Hoodia* Arten [nach van Heerden 1999]

1997 lizenzierte der CSIR das Patent für die britische Biotechnologie Firma Phytopharm. Ziel war eine bessere Erforschung und spätere Vermarktung. Die Vermarktungsrechte sollten hierbei beim CSIR verbleiben. Der Pharma Produzent Pfizer übernahm diese Rechte 1998 von Phytopharm, um aus P57 einen Arzneistoff gegen Adipositas zu entwickeln. Allerdings gab Pfizer 2003 diese Rechte an Phytopharm zurück und stellte die klinische Entwicklung von P57 ein. Gerüchten zufolge gab es Schwierigkeiten bei der Entwicklung; so sollen einige Komponenten der Formulierung, die nicht entfernt werden konnten, negative Auswirkungen auf den Lebermetabolismus gezeigt haben. Heute hat der Konzern Unilever die exklusiven Rechte an P57 [Lee und Balick 2007].

Als die Khoy San von der geplanten Vermarktung erfuhren, drohten sie mit einer Klage gegen den CSIR wegen Bio-Piraterie. Ihnen sei das traditionelle Wissen um die Verwendung der Pflanze vom CSIR gestohlen worden. Mit der Unterstützung von WIMSA (Working group of indigenous Minorities in Southern Africa) und dem South African San Council und dem San Institute of South Africa (SASI) machten sie ihre Ansprüche geltend. In einer Vereinbarung von 2003 werden dem CSIR alle exklusiven Rechte zur Vermarktung zugesprochen, den San stehen dagegen 6% der Gewinne der Forschungseinrichtung an *Hoodia* zu. Im Falle einer erfolgreichen Vermarktung würden den San demnach 0,03 bis 1,2 % der Nettoverkäufe zustehen [Wynberg 2004]. Zurzeit befindet sich das aktive Prinzip in der letzten klinischen Phase und könnte eventuell als Nahrungsergänzungsmittel von der Firma Unilever vertrieben werden [Reihling 2008].

Zusätzlich sind Extrakte aus *Hoodia gordonii* mittlerweile patentiert für die antidiabetische Aktivität und für die Prävention von Aspirin induzierten gastrischen

Schäden [Rubin et al. 2001, Horak et al. 2004]. Andere mögliche Eigenschaften wie eine erkältungslindernde und auch eine aphrodisierende Wirkung werden derzeit noch diskutiert.

Aufgrund der Hunger unterdrückenden Eigenschaften besteht eine immer größere Nachfrage nach *Hoodia gordonii* auf dem Weltmarkt. Diese Spezies ist derzeit auf der Liste der gefährdeten Arten. Der Export aus Südafrika ist streng reglementiert und ein Verkauf von wild geerntetem oder kultiviertem *Hoodia* aus Namibia ist nicht gestattet [Carr 2006]. Auf dem US Markt sind derzeit etwa 100 Produkte auf dem Markt, z.B. Tabletten, Flüssiggele, Snack Riegel oder Säfte. Aufgrund der Knappheit der Ressourcen bei ständig steigender Nachfrage wird eine Verfälschung der *Hoodia* Produkte mit anderen Arten aus derselben Gattung oder aus verwandten Arten, wie z.B. *Stapelia* immer wahrscheinlicher. Eine mögliche Verunreinigung ist auch der Feigenkaktus *Opuntia ficus-indica*. Diese Pflanze aus Nord- und Zentralamerika wächst sehr schnell, zeigt allerdings keinerlei hungerunterdrückende Wirkung [Avula et al. 2006, 2007].

P57, die aktive Komponente, ist ein Oxypregnansteroid (3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-Thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-  $\beta$ -D-Cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-  $\beta$ -D-Cymaropyranosyloxy]-12- $\beta$ - Tigloyloxy- 14 $\beta$ -Hydroxypregn-5-en-20-on, Abb. 1.12). Inzwischen konnten neben dieser Substanz weitere Steroidglykoside nachgewiesen werden [Dall'Acqua und Innocenti 2007, Pawar et al. 2007b, Abrahamse et al. 2007]. Hierbei handelt es sich vor allem um Oxypregnanglykoside. Die am häufigsten vorkommenden Zucker sind 6-Desoxyhexosen (Rhamnose, Thevetose), 2,6-Didesoxyhexosen (Cymarose, Oleandrose, Digitoxose) und Glucose (Abb. 1.13) [Pawar et al. 2007b].

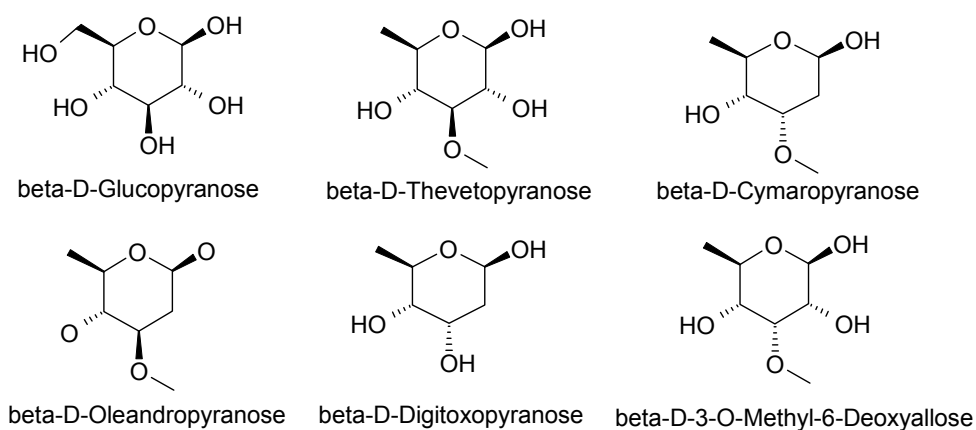


Abb. 1.13: Zuckerreste in Steroidglykosiden aus *Hoodia* Spezies

Substanzname	Formel und MG	Aglykon	Quelle
<b>Grundgerüst : 12-O-β-Tigloyl-3β,14β-Dihydroxypregn-5-en-20-on</b>			
<b>Hoodigosid 1A</b> <b>Gordonosid 1</b>	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> O <sub>5</sub> MG 431,3	/	2
<b>Hoodigosid A</b>	C <sub>40</sub> H <sub>62</sub> O <sub>12</sub> MG 734,4	3-O-β-D-The-(1→4)-β-D-Cym	1
<b>Hoodigosid B</b>	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>16</sub> MG 894,5	3-O-β-D-Thev-(1→4)-β-D-The-(1→4)-β-D-Cym	1
<b>Hoodigosid C</b> <b>Gordonosid 3</b>	C <sub>54</sub> H <sub>86</sub> O <sub>18</sub> MG 1022,5	3-O-β-D-The-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym- (1→4)-β-D-Cym	1, 2
<b>Hoodigosid D</b>	C <sub>54</sub> H <sub>86</sub> O <sub>19</sub> MG 1038,5	3-O-β-D-The-(1→4)-β-D-The-(1→4)-β-D-Cym- (1→4)-β-D-Cym	1
<b>Hoodigosid E</b> <b>Gordonosid 8</b>	C <sub>53</sub> H <sub>84</sub> O <sub>20</sub> MG 1040,5	3-O-β-D-Glu-(1→4)-β-D-The-(1→4)-β-D-Cym- (1→4)-β-D-Cym	1, 2
<b>Hoodigosid F</b>	C <sub>60</sub> H <sub>96</sub> O <sub>23</sub> MG 1284,6	3-O-β-D-Glu-(1→4)-β-D-Ole-(1→4)-β-D-The-(1→4)- β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	1
<b>Hoodigosid G</b>	C <sub>60</sub> H <sub>96</sub> O <sub>23</sub> MG 1284,6	3-O-β-D-Glu-(1→4)-β-D-Cym (1→4)-β-D-The- (1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	1
<b>Hoodigosid H</b>	C <sub>60</sub> H <sub>96</sub> O <sub>22</sub> MG 1168,6	3-O-β-D-Glu-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym- (1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	1
<b>Hoodigosid I</b>	C <sub>60</sub> H <sub>96</sub> O <sub>22</sub> MG 1168,6	3-O-β-D-Glu-(1→4)-β-D-Ole-(1→4)-β-D-Cym- (1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	1
<b>Hoodigosid J</b>	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> O <sub>22</sub> MG 1154,6	3-O-β-D-Glu-(1→4)-β-D-Ole-(1→4)-β-D-Dig-(1→4)- β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	1
<b>Hoodigosid K</b>	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>18</sub> MG 898,4	3-O-β-D-Gluc-(1→6)-β-D-Glu-(1→4)-β-D-Cym	1

<b>Hoodigosid 12</b> <b>Formula 6</b> <b>P57AS3</b>	$C_{47}H_{74}O_{15}$ MG 878,5	3-O- $\beta$ -D-The (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym	1; 5; 6
<b>Gordonosid B</b>	$C_{54}H_{86}O_{18}$ MG 1022,6	3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -The-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Ole-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym]	2
<b>Gordonosid D</b>	$C_{53}H_{84}O_{17}$ MG 992,6	3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -Dig-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Ole-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym]	2
<b>Gordonosid E</b>	$C_{54}H_{86}O_{17}$ MG 1006,6	3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -Ole-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Ole-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym]	2
<b>Gordonosid F</b>	$C_{54}H_{86}O_{17}$ MG 1006,6	3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -Ole-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym]	2
<b>Gordonosid G</b> <b>Formel 10</b>	$C_{54}H_{86}O_{17}$ MG 1006,6	3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym]	2; 5
<b>Gordonosid I</b>	$C_{60}H_{96}O_{20}$ MG 1136,6	3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -Dig-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Ole-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Ole-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym]	2
<b>Gordonosid L</b> <b>Formel 11</b>	$C_{61}H_{98}O_{20}$ MG 1150, 7	3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -Ole-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym]	2; 5
<b>Compound 2</b>	$C_{54}H_{86}O_{18}$ MG 1022,5	3 $\beta$ -[ $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-6-The-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Cym]	4
<b>Formula 12</b>	$C_{54}H_{86}O_{18}$ MG 1022,6	Ole-Mda-Cym-Cym	5
<b>Formula 7</b>	$C_{54}H_{86}O_{18}$ MG 1022,6	Cym-Mda-Cym-Cym	5
<b>Formula 8</b>	$C_{53}H_{84}O_{17}$ MG 992,6	Ole-Dig-Cym-Cym	5
<b>Formula 9</b>	$C_{54}H_{86}O_{17}$ MG 1006,6	Ole-Cym-Cym-Cym	5

Grundgerüst: Calogenin			
<b>Hoodigosid L</b>	C <sub>58</sub> H <sub>94</sub> O <sub>26</sub> MG 1206,6	20-O-β-D-Glu-(1→6)- β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-tig)-D-The)-(1→4)-β-D-Ole	3
<b>Hoodigosid V</b>	C <sub>46</sub> H <sub>74</sub> O <sub>16</sub> MG 882,5	20-O-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-Tig)-D-The)-(1→4)-β-D-Ole	3
<b>Hoodigosid M</b>	C <sub>53</sub> H <sub>88</sub> O <sub>25</sub> MG 1124,5	20-O-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-D-The-(1→4)-β-D-Ole	3
<b>Hoodigosid N</b>	C <sub>35</sub> H <sub>58</sub> O <sub>10</sub> MG 638,4	3-O-β-D-The-(1→4)-β-D-Ole	3
<b>Hoodigosid O</b>	C <sub>52</sub> H <sub>84</sub> O <sub>21</sub> MG 1044,5	20-O-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-Tig)-D-The-(1→4)-β-D-Ole	3
<b>Hoodigosid P</b>	C <sub>58</sub> H <sub>94</sub> O <sub>25</sub> MG 1190,6	20-O-β-D-Glu-(1→6)- β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-Tig)-D-Ole-(1→4)-β-D-Cym	3
<b>Hoodigosid Q</b>	C <sub>65</sub> H <sub>106</sub> O <sub>29</sub> MG 1350,7	20-O-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-Tig)-D-The-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	3
<b>Hoodigosid R</b>	C <sub>65</sub> H <sub>106</sub> O <sub>28</sub> MG 1334,7	20-O-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-tig)-D-Ole-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	3
<b>Hoodigosid S</b>	C <sub>72</sub> H <sub>118</sub> O <sub>31</sub> MG 1478,7	20-O-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-Tig)-D-Ole-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	3
<b>Hoodigosid T</b>	C <sub>66</sub> H <sub>108</sub> O <sub>26</sub> MG 1316,7	20-O-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-Tig)-D-Ole-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	3
<b>Hoodigosid U</b>	C <sub>72</sub> H <sub>118</sub> O <sub>31</sub> MG 1478,7	20-O-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-(1→6)-β-D-Glu-3-O-β-(4-O-Tig)-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym-(1→4)-β-D-Cym	3

Tab. 1.1: Zusammenfassung der bisher in Hoodia nachgewiesenen Steroidglykoside (Glu: Glucopyranose, The: Thevetopyranose, Cym: Cymaropyranose, Ole: Oleandropyranose, Dig: Digitoxopyranose, Mda: Methyl-6-Deoxyallose; Quelle: 1: Pawar et al. 2007a; 2: Dall'Acqua und Innocenti 2007; 3: Pawar et al. 2007b, 4: van Heerden et al. 1999; 5: Abrahamse et al. 2007)

Neben den Oxypregnanglykosiden mit dem 12-O- $\beta$ -Tigloyl-3 $\beta$ ,14 $\beta$ -Dihydroxypregn-5-en-20-on (Hoodigogenin) Aglykon, die von den Autoren Hoodigoside und Gordonoside genannt wurden, konnten auch neun Calogenin-Bidesmoside und ein Calogenin-Monodesmosid isoliert werden [Dall'Acqua und Innocenti 2007, Pawar et al. 2007a/b]. Calogenin ist nicht für den Genus *Hoodia* spezifisch, kommt aber in anderen Arten der Familie Asclepiadaceae, wie *Hemidesmus indicus* [Deepak et al. 1996, Sigler et al. 2000], *Leptadenia reticulata* [Srivastav et al. 1994], *Oxystelma esculentum* [Trivedi et al. 1989], *Periploca calophylla* [Siciliano et al. 2005] und *Caralluma russeliana* [Al-Yahya et al. 2000] vor. Die in *Hoodia*-Arten bisher nachgewiesenen Steroidglykoside sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Die Substanzen wurden z.T. auf ihre zytotoxische und antioxidative Aktivität untersucht.

Die Wirkungsweise von P57 wurde von MacLean und Luo [2004] untersucht. Das Steroidglykosid erhöht den Adenosintriphosphatgehalt in den Hypothalamusneuronen, welche die Nahrungsmittelaufnahme regulieren [MacLean und Luo 2004].

## **1.6 Verfärbungen von Lebensmitteln**

Verfärbungen von Lebensmitteln durch Verarbeitung oder Lagerung ist ein seit Jahrhunderten bekanntes Phänomen. Hier sind sowohl gewünschte als auch ungewünschte Verfärbungen bekannt. Die ungewünschte Verfärbung von rohen und verarbeiteten Lebensmitteln stellt seit Jahren ein großes Problem dar und verursacht jährlich signifikante Schäden und Ausfälle. Die angestrebten Verfärbungen dienen vor allem der Aromabildung und Ausprägung. Die Verfärbungsreaktionen können auf unterschiedliche Faktoren zurückgeführt werden. Im allgemeinen kann man hierbei zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionen unterscheiden.

### **1.6.1 Enzymatische Verfärbungsreaktionen**

Bei den enzymatischen Verfärbungen spielt die enzymatische Bräunung eine wichtige Rolle. Betroffen sind rohe Früchte und Gemüsearten, die sich nach einer Verletzung der Zellstruktur rasch bräunlich verfärben. Dies beruht auf der Oxidation von phenolischen Substanzen durch Polyphenoloxidasen. Abhängig von der Art des Enzyms und der umgesetzten Polyphenole ergeben sich braune bis schwarze Verfärbungen. So führen die Aminosäuren Tyrosin und Dopa zu Melaninen während

nicht stickstoffhaltige Phenole, wie Catechine oder Chlorogensäure, zu braunen, chemisch weniger definierten Produkten führen.

### **1.6.2 Nicht enzymatische Verfärbungsreaktionen**

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die sogenannte nicht enzymatische Bräunung, die Maillard Reaktion. Diese Reaktion ist für die Herstellung vieler Lebensmittel und ihrer Weiterverarbeitung essentiell und erwünscht. So entstehen während der Maillard Reaktion neben der braunen Verfärbung für das Aroma unerlässliche Geschmacks- und Geruchskomponenten [Belitz et al. 2008].

Die Reaktion wurde nach dem französisch-algerischen Mediziner und Pharmazeuten Louis Camille Maillard (1878-1936) benannt. Sie tritt beim Erhitzen gewisser, v.a. Protein- und Kohlenhydratreicher Lebensmittel über 120°C auf. Die Reaktion ist sehr komplex und konnte bis in die heutige Zeit noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es handelt sich um die Reaktion von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern, die in zwei Phasen verläuft. Bei der Reaktion von Aminosäuren, Proteinen oder Peptiden mit reduzierenden Zuckern entstehen zunächst Imine, die Amadori-Verbindungen genannt werden. Aufgrund ihrer Instabilität reagieren diese weiter zu Carbonylen, Dicarbonylen, Aldehyden und Aminen [Belitz et al. 2008].

Die entstehenden braunen pigmentartigen Substanzen (Melanoide) geben den Lebensmitteln Geruch, Geschmack, Farbe und Aroma. In den letzten Jahren ist jedoch auch immer häufiger das krebserregende Potential einiger Produkte der Maillard Reaktion in der Diskussion, wie z. B. Acrylamid.

Viele der neben diesen beiden Wegen entstehenden Verfärbungsreaktionen sind bis heute wenig erforscht oder noch nicht abschließend bekannt. 2007 haben zu diesem Thema Adams und Brown einen Übersichtsartikel veröffentlicht, der sich mit dieser Problematik beschäftigt.

### **1.6.3 Verfärbungen von *Allium*-Arten**

Knoblauch bildet während der Verarbeitung unter bestimmten Bedingungen grüne oder blaugrüne Pigmente, Zwiebeln und Lauch dagegen rosa oder rote Pigmente. Die Verfärbungen während der Verarbeitung führen zu einer Verschlechterung der organoleptischen Eigenschaften des fertigen Produktes und damit zu großen

wirtschaftlichen Schäden [Kubec und Velisek 2007]. Obwohl diese Phänomene schon seit über 50 Jahren untersucht werden, sind bisher wenig Informationen über die Prozesse, die zu den Verfärbungen führen, und über die Struktur der Pigmente bekannt. Die bisherigen Ergebnisse bauen aufeinander auf und widersprechen sich zum großen Teil nicht. Die genauen Mechanismen sind allerdings immer noch unbekannt und wurden bisher auch nur in Modellsystemen untersucht [Imai et al. 2006b]. Die Ausbildung der Pigmente scheint abhängig zu sein von den in der Zwiebel enthaltenen Cysteinsulfoxiden, der Lagertemperatur, sowie pH-Wert, Extraktionstemperatur und Lösungsmittel der Extrakte.

Die grüne Verfärbung, die bei tiefen Temperaturen gelagerter Knoblauch bei der Verarbeitung, besonders in Gegenwart von Säuren zeigt, ist allerdings nicht in jedem Fall und in jedem Kulturkreis unerwünscht. In der chinesischen Tradition ist der grüne Laba-Knoblauch eine Spezialität, die zum chinesischen Neujahrsfest vorbereitet wird. Der achte Dezember wird im chinesischen Mondkalender „Laba“ genannt. An diesem Tag wird der im nördlichen China über vier Monate kalt gelagerte Knoblauch in Essig eingelegt. Dieser verfärbt sich grün und wird zum Neujahrsfest als Delikatesse gegessen. Er zeichnet sich durch seinen eigenen Geschmack, der nicht mit frischem Knoblauch vergleichbar ist, aus [Bai et al. 2005].

Für die Verfärbungen wurden zunächst verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht. So wurden Bakterien und Pilze [Lukes 1959] als Ursache ebenso diskutiert, wie die Bildung von Betaninen [Joslyn und Peterson 1958] oder Chinonen durch die Oxidation von Polyphenolen, die dann wiederum mit Aminosäuren reagieren [Körner und Berk 1967]. Die nichtwissenschaftliche Presse machte für dieses Phänomen zeitweilig die Bildung von Kupfersulfat durch die Reaktion von schwefelhaltigen Inhaltsstoffen des Knoblauchs mit Kupferionen verantwortlich [Kubec und Velisek 2007]. Erst Lee und Parkin [1998] untersuchten dann die Pigmentbildung in Abhängigkeit vom Gesamtthiosulfinatgehalt und dem pH-Wert [Kubec et al. 2004].

Bisher wurden die Vorgänge, die zur Bildung der farbigen Pigmente führen, nur in Modellsystemen untersucht. So konnten Imai et al. [2006a] in Systemen aus Isoalliin, Alliin, Alliinase und Aminosäuren ein konjugiertes Pigment und zwei Vorläufersubstanzen isolieren (Abb. 1.14). Die Vorläufersubstanzen sind N-substituierte Pyrrole, deren Substitutionsmuster den eingesetzten Aminosäuren entspricht. Aus diesen Ergebnissen leiteten sie das in Abbildung 1.14 wiedergegebene Reaktionsschema ab.



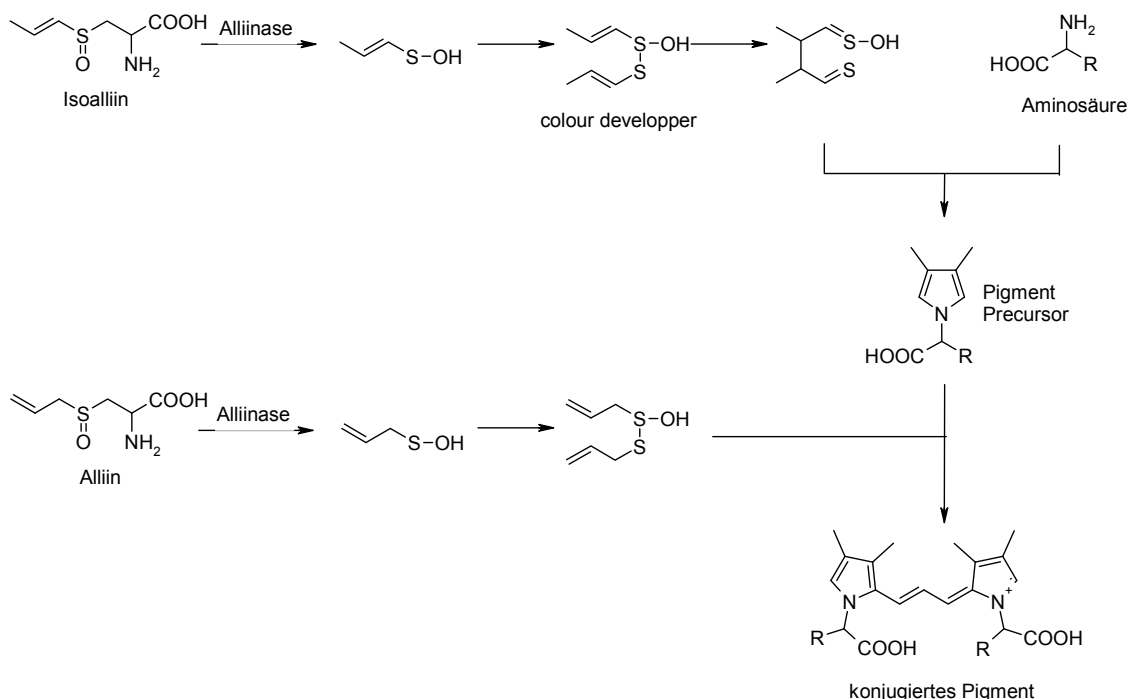


Abb. 1.14: Vermutete Reaktion zu den farbigen Pigmenten von Zwiebel und Knoblauch, der Pigment Precursor und das konjugierte Pigment konnten in Modellsystemen nachgewiesen werden [nach Imai et al. 2006a]

Die Reaktion, die zu den Verfärbungen führt, ist also eine komplizierte mehrstufige Reaktion, an der vor allem Isoalliin beteiligt ist. In mehreren enzymatischen und nicht enzymatischen Schritten reagiert Isoalliin zusammen mit anderen Cysteinsulfoxiden zu den Pigmenten. In einem ersten Schritt werden hierbei zunächst enzymatisch die korrespondierenden Thiosulfinate gebildet. Diese reagieren in nachfolgenden, vermutlich nichtenzymatischen Schritten, mit verschiedenen Aminosäuren zu den Pigmenten [Kubec und Velisek 2007]. Ein Zusammenhang zwischen der Pigmentbildung und den 1-Propenylthiosulfinaten wurde bereits von Shannon et al. [1967a/b] vermutet. Diese Idee wurde allerdings nicht weiter verfolgt und ist erst in den letzten Jahren wieder aufgenommen worden. Die Bildung der Pigmente scheint von einer Vielzahl verschiedener Faktoren abhängig zu sein. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei vermutlich die Konzentration an Isoalliin, während die anderen Cysteinsulfoxide offensichtlich nur eine untergeordnete Bedeutung haben. Die entstehenden 1-Propenylthiosulfinate, die an den weiteren Reaktionen zu den Pigmenten beteiligt sind, spielen allerdings auch als Vorläufersubstanzen der für diese Spezies wichtigen Aromastoffe und pharmazeutisch bedeutsamen Stoffen eine Rolle. Eine Auswahl von Sorten mit geringerem Isoalliin Gehalt würde also vermutlich neben einer Verringerung

der Verfärbungen auch eine Verminderung des gewünschten Aromas und der pharmazeutischen Wirksamkeit mit sich führen [Kubec und Velisek 2007].

In der neuesten Studie wird sogar von einem sechsstufigen Reaktionsmechanismus zur Bildung der Pigmente von Knoblauch ausgegangen (Abb. 1.15). Zunächst reagiert hierbei Isoalliin mit Alliinase zu dem entsprechenden Thiosulfinat (Schritt 1). Das bei der Reaktion von Di-(1-Propenyl)Thiosulfinat mit Aminosäuren entstehende 2-(1*H*-3,4-Dimethyl-1*H*-Pyrrolyl)Carboxylat wird als Pigmentprecursor oder Colour developer bezeichnet (Schritt 2). Nur 1-propenylhaltige Thiosulfinate können mit Aminosäuren zu gefärbten Verbindungen reagieren [Wang et al. 2008]. Werden diese Modellschubstanzen zu einer frisch homogenisierten Masse von frischem Knoblauch gegeben, bilden sich grüne Pigmente. Hierbei ist die Intensität der Farbe offensichtlich abhängig von der Länge der Aminosäure-Seitenkette, je kürzer, desto intensiver ist die resultierende Verfärbung. Aminosäuren mit einer kürzeren Seitenkette wie Glycin, Alanin und Valin führen daher zu stärkeren Verfärbungen als beispielsweise Isoleucin oder Phenylalanin [Wang et al. 2008]. In Schritt 3 erfolgt die analoge Reaktion zu Schritt 1 mit Alliin als Substrat zu Di-(2-Propenyl)Thiosulfinat. In Schritt 4 wird die gelbe Spezies durch die Reaktion des Pigment Precursors mit Pyruvat, einem Nebenprodukt der Alliinase Reaktion, gebildet. Gleichzeitig findet parallel die Reaktion zwischen dem Precursor und Di-(2-Propenyl)Thiosulfinat zu blauen Pigmenten statt. Schritt 6 stellt einen anderen Weg zu den gelben Pigmenten dar. Dieser Schritt stellt eine Abbaureaktion der blauen Pigmente aus Schritt 5 dar. Die Mischung der gelben und blauen Pigmente führt zu der grünen Verfärbung. Der dargestellte Weg ist vermutlich nicht der einzig mögliche Biosyntheseweg; die Bildung der Pigmente ist ein sehr komplexer Vorgang [Wang et al. 2008].

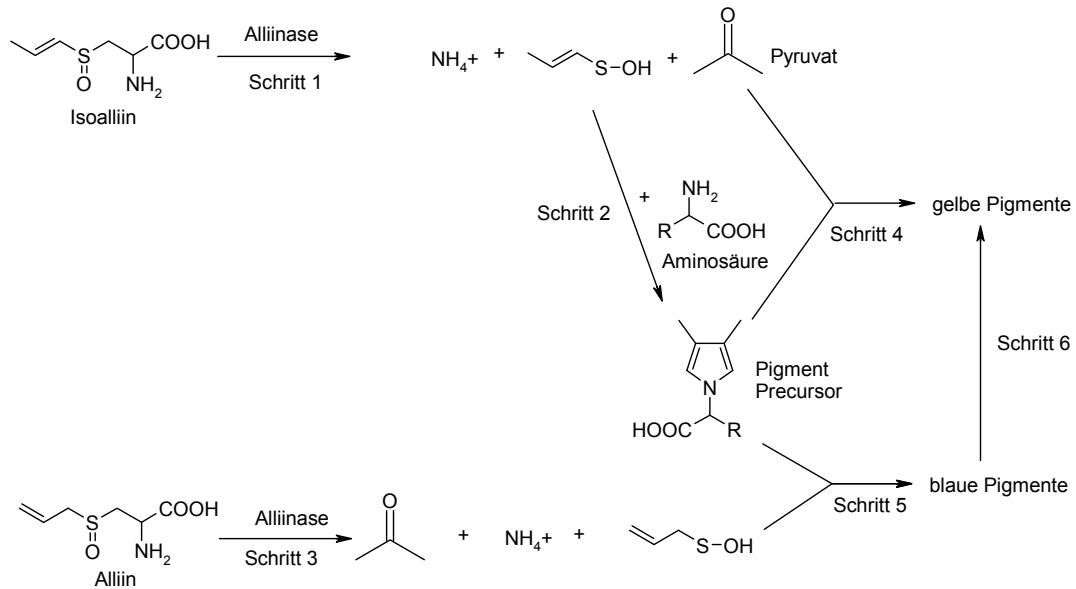


Abb. 1.15: Vermuteter Mechanismus der Synthese der grünen Verfärbung in Knoblauch. Durch die Kombination der gelben und blauen Pigmente erscheint die Farbe grün [nach Wang et al. 2008]

Zwiebeln, die bei 5°C gelagert werden, enthalten signifikant mehr Isoalliin als Vergleichsproben [Kopsell und Randle 1999]. Unter diesen Bedingungen steigt auch im Knoblauch der Gehalt an 2-Propenyl-Thiosulfinaten [Lawson et al. 1991]. Die Beteiligung von Isoalliin bei der Verfärbung würde also mit der Beobachtung übereinstimmen, dass kalt gelagerte Pflanzen eher zur Verfärbung neigen [Lukes 1986]. Im Falle der Küchenzwiebel ist die Bildung von Pigmenten ebenfalls abhängig von der Aktivität der Enzyme Alliinase und LF-Synthase. Je aktiver die Synthase, umso weniger Pigmente entstehen, da die durch die Aktivität der Alliinase entstehenden Thiosulfinate von der Synthase sofort zum Tränenfaktor umgewandelt werden. Dadurch stehen diese nicht mehr für die Synthese der Pigmente zur Verfügung. Eine hohe LF-Synthase Aktivität führt demnach also zu Küchenzwiebeln mit einer großen Schärfe, aber mit geringer Neigung zur Verfärbung [Kubec und Velisek 2007]. Alle Schritte der Bildung des Farbstoffes werden stark vom pH-Wert beeinflusst. Die Bildung von Thiosulfinaten findet bevorzugt bei pH-Werten zwischen 4,5 und 5,0 statt. Dieser Bereich scheint also auch die Bildung von Farbstoffen zu unterstützen [Kubec und Velisek 2007]. Es zeigte sich, dass Zwiebeln, die vor dem Homogenisieren hitzebehandelt wurden, stärkere Verfärbungen zeigen als unbehandelte Zwiebeln [Imai et al. 2006b].

Die Reaktionen die zur Bildung der Pigmente führen sind also sehr komplex, schon in Modellsystemen wird von der Bildung verschiedener farbiger Verbindungen berichtet. Die Zusammensetzung der natürlich gebildeten Pigmente konnte daher noch nicht aufgeklärt werden [Kubec und Velisek 2007]. Die Biosynthese umfasst vermutlich die Reaktion von Aminoverbindungen mit Carbonylen. Dies legt einen Vergleich mit der ebenfalls sehr komplexen Maillard Reaktion nahe [Kubec et al. 2004].

In einer aktuellen Studie konnte auch ein Zusammenhang zwischen der  $\gamma$ -Glutamylpeptidase Aktivität und der Verfärbung von Knoblauch festgestellt werden. So führte die Zugabe von  $\gamma$ -Glutamylpeptidase zu Homogenisaten zu einer grünen Verfärbung. Bei kalter Lagerung steigt ausserdem die Aktivität des Enzyms [Li et al. 2008]. Diese Untersuchung zeigt, dass noch viele Fragen zu diesem Thema ungeklärt und die Kenntnisse über die Verfärbung noch sehr begrenzt sind.

### **1.7 Ziel der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil des Programms "Zwischen Europa und Orient - Mittelasien/Kaukasus im Fokus der Wissenschaft" der Deutschen Volkswagenstiftung. Die in Zentralasien häufig und in großer Anzahl und Varietät vorkommenden Arten des Subgenus *Melanocrommyum* sind bisher kaum wissenschaftlich untersucht worden. Dies ist wohl zum großen Teil darin begründet, dass diese Arten vor allem in den abgelegenen Bergregionen zu finden sind. In Europa und Amerika sind sie nicht, oder nur als Ziergewächse bekannt. Dabei konnte durch Befragungen der örtlichen Bewohner eine Vielzahl von pharmazeutischen Nutzungen dieser Pflanzen ermittelt werden. Eine genauere Untersuchung dieser Arten ist notwendig, um mehr Informationen über die Wirkungen und die daran beteiligten Inhaltsstoffe zu erhalten.

Der wohl auffälligste Unterschied zu den weit verbreiteten *Allium*-Arten wie Knoblauch oder Küchenzwiebel ist die rote Verfärbung, die bei einer Beschädigung des Zellgewebes einiger Arten dieses Subgenus auftritt. Erst vor kurzem ist die Isolierung des hieran beteiligten roten Farbstoffes für *A. giganteum* gelungen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten auf komplexe Vorgänge in der Pflanze bei der Verfärbung hin. So ist der Farbstoff, das Dithiodipyrrol, relativ instabil und unterliegt weiteren Reaktionen. Auch über die Biosynthese dieser Komponente ist wenig bekannt. Die Reaktion scheint aber zumindest teilweise enzymatisch katalysiert zu sein.

Um die Vorgänge in der Pflanze und die daran beteiligten Reaktionen besser zu verstehen, ist eine genauere Untersuchung der Biosynthese des roten Farbstoffes nötig. Von entscheidender Bedeutung sind hierbei zwei Punkte. Zum einen müssen nähere Informationen über die Art und die Struktur der Vorläufersubstanz des Farbstoffes ermittelt werden. Zum anderen ist eine genauere Untersuchung des an der Umsetzung beteiligten Enzyms nötig. Durch diese beiden Punkte können wichtige Kernpunkte der Biosynthese ermittelt werden.

Dies gibt einen wichtigen Einblick in die vielfältigen Reaktionen der schwefelhaltigen Inhaltsstoffe. Die Reaktionen in den *Melanocrommyum*-Arten scheinen sich hier in einigen Punkten von den gut untersuchten Arten *A. cepa* und *A. sativum* zu unterscheiden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist auch die Untersuchung weiterer *Melanocrommyum*-Arten auf das Vorhandensein des Farbstoffes. Es soll bestimmt werden, ob dieser Farbstoff in allen Arten vorkommt, oder ob sich Variationen in der Struktur ergeben. Zusätzlich stellt der Farbstoff sehr wahrscheinlich nicht das einzige entstehende Produkt dar. Sowohl der Farbstoff als auch dessen Vorläufersubstanzen und die Zwischenverbindungen der Reaktion unterliegen möglicherweise vielfältigen Reaktionen. Vergleicht man die Struktur des Dithiodipyrrols mit den bekannten Verbindungen aus anderen *Allium*-Arten, so lassen sich hieraus eine Vielzahl möglicher Reaktionen und Produkte ableiten. Die zu untersuchenden Zwiebeln sollen also nicht nur auf den Farbstoff, sondern auch auf mögliche Folge- und Nebenprodukte untersucht werden.

Neben den Schwefelverbindungen weisen die *Melanocrommyum*-Arten noch eine zweite, bedeutende Inhaltsstoffgruppe auf, die Steroidsaponine. Bisher konnten bereits einige Saponine aus diesen Arten isoliert und bestimmt werden. Neben den Schwefelverbindungen scheinen sie für eine Vielzahl der pharmazeutischen Wirkungen verantwortlich zu sein. So konnten zytostatische und zytotoxische Wirkungen nachgewiesen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung einer HPLC-MS Screening Methode zur Detektion von Saponinen. Hiermit sollen weitere Informationen über diese zweite, wichtige Gruppe von Inhaltsstoffen erlangt werden.

Zusätzlich sollte diese Untersuchung auf weitere Pflanzenarten ausgeweitet werden. Hierzu wurde die Gattung *Hoodia* sowie verwandte Arten ausgewählt. *Hoodia* ist erst in den letzten Jahren in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Die Entdeckung eines hungerunterdrückenden Steroidsaponines führte zu einigen weiteren Untersuchungen an diesen Arten. In der Folge wurden mehrere andere Substanzen detektiert.

Die Steroidsaponine in *Hoodia*-Arten sowie in einigen verwandten Arten, wie z.B. *Stapelia* Arten, sollen also mittels HPLC-MS untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 verwendete Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nichts anders angegeben, von den Firmen Fluka/Sigma (Sigma-Aldrich Fine Chemicals, Seelze/Dreieisenhofen) oder Merck (Darmstadt) in p.a.-Qualität bezogen, und sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Auch die für die HPLC und HPLC MS verwendeten Lösungsmittel können Tabelle 2.1 entnommen werden.

Reinstwasser zur Herstellung von Puffern, Lösungen und Standards wurde über eine „Milli-Q Reagent-Anlage“ der Firma Millipore, Eschborn, gewonnen.

Substanz	Hersteller
Brenzcatechin	Fluka (Sigma-Aldrich Fine Chemicals), Seelze/Deisenhofen
Citronensäure Monohydrat	
Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz	
Formaldehyd (37%)	
Kalium-Natriumtartrat	
Kupfersulfat Pentahydrat	
Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranose	
Natriumcarbonat wasserfrei	
Natriumhydroxid	
Silbernitrat	
Seesand	
Thioglykolsäure	

Ammoniumchlorid	
Ammoniumperoxodisulfat	
Butanol	
Calciumchlorid Dihydrat	
Dichloromethan	
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	
EDTA	
Essigsäure (100%)	
Ethanol	
Ethylacetat	
Gallussäure	
Glycerol wasserfrei	
Glycin Puffersubstanz	
Hydrochinon	
Kaffeesäure	
Kaliumdihydrogensulfat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Kalium-Natriumtartrat	
Kieselgel 60	
Laktatdehydrogenase (LDH) aus Schweinemuskel (5000 U/ml)	
Magnesiumchlorid Hexahydrat	
Mangan(II)-chlorid Dihydrat	
2-Methyl-2-propanthiol	
Natriumchlorid	
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	
Natriumtetraborat decahydrat	
Nickelsulfat Hexahydrat	
Ninhydrin	
ortho-Phthaldialdehyd	
Pyridoxal-5'-phosphat	
Rinderserumalbumin (BSA)	
Salzsäure (32%)	



Methanol HPLC-grade und HPLC-MS-grade Acetonitril HPLC-grade und HPLC-MS-grade Wasser HPLC-MS-grade	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid Kaliumhydroxid Petrolether (40-60 °C) Resorcin	Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich Fine Chemicals), Seelze/Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G250 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	SERVA, Heidelberg
Concanavalin A immobilisiert an Sepharose	GE Healthcare
Bradford Reagenz Concanavalin A immobilisiert auf Agarose Diphosphopyridinnucleotid reduziert Dinatriumsalz-Hydrat (NADH) LDH suspension (18.5U/5 µl) Low Molecular Weight Range SigmaMarker N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) D-(+)-Saccharose Thimerosal	Sigma (Sigma-Aldrich Fine Chemicals), Seelze/Deisenhofen
Acrylamid/bis-Acrylamid 19:1 40% RotiLoad Standard Roti-Mark Standard	Roth, Karlsruhe
Dopamin, 99%	Acros, Geel (Belgien)

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien und Lösungen

## 2.2 Pflanzenmaterial

Ein Teil der für diese Untersuchung verwendeten *Allium*-Arten wurden von den Originalstandorten in Georgien, Tadschikistan, Usbekistan oder dem Iran bezogen. Ein weiterer Teil stammte aus der Lebendpflanzenkollektion des IPK Gatersleben. Dort wurden Belegexemplare der Pflanzen aus den Ursprungsländern hinterlegt und nachgezüchtet. Ein Teil dieser Nachzuchten wurde als Proben verwendet.

Die verwendeten Arten sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Die für die Bestimmung der Steroide in *Hoodia* und verwandten Pflanzen verwendeten Arten sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Die Proben wurden lyophilisiert von Herbresearch Germany (Tussenhausen-Mattsies) bezogen.

Spezies	Tax oder Acc-Nummer	Herkunft
<i>A. aflatunense</i> B. Fedtsch.	0578	Gatersleben Botanischer Garten Tashkent, Usbekistan
	2121	Gatersleben Botanischer Garten Marburg, Deutschland
	3692	Gatersleben (Kazachstan 1993) Kindyktas-Berge, ca. 60 km nördl. von Bishkek, westlicher Beginn des Passes Kur dai
<i>A. akaka</i> Gmelin ex Schult. et Schult. f.	1025	Iran 2004 Zentral Kopetdag, nahe der Hauptroute nach Dargaz, Höhe 1750 m
	1053	Iran 2005 Straße von Asalem nach Khalkhal, Höhe 2100 m
<i>A. alexejanum</i> Regel	4242	Usbekistan 2006 Turkestan Gebirge, Zomin Tal, über dem höchsten Sanatorium, Höhe 2200 – 2400 m
	6141	Tadschikistan 2004 Qozkhona Berg, nächster Berg östlich der Mündung des Saritag Flusses, Höhe 2500 m

<i>A. atrovioleaceum</i> Boiss.	1051	Iran 2005 Östlicher Vorort von Qazvin, Höhe 1300 m
<i>A. chelotum</i> Wendelbo	1006	Iran 2004 Golestan Nationalpark, Golza Tal, Höhe 950 m
<i>A. christophii</i> Trautv.	0004	Turkmenistan 2002 Kopetdag, Chuli ca. 30 km westl. von Ashgabat, Höhe ca. 700 m
	1016	Iran 2004 Nahe dem Pass Jakhtikalon, Südost Grenze des Golestan Gebietes, Höhe 1700 m
<i>A. elburzense</i> Wendelbo	1208	Iran 2007 Elburz Gebirge, Tochal Massiv, Palanchal Tal nördl. von Teheran, Höhe 2600 m
<i>A. giganteum</i> Regel	0050	Turkmenistan 2002 Kopetdag, oberes Tal des Chuli, über den Quellen, Höhe 920 m
	1028	Iran 2004 Zentral Kopetdag, nahe der Hauptroute nach Dargaz, Höhe 1450 m
	1035	Iran 2004 Binalud Massiv nahe Kharv e Olya, Höhe 1750 m
	4165	Usbekistan 2003 25 km westlich von Bajssun, Höhe 1000 m
	6048	Tadschikistan 2003 um Mazori Khodzha Mumin, südl. Exposition, Höhe 1200 m
	6089	Tadschikistan 2003 Auf dem Weg von Dashti Sardolyak und Kuffo, Dashti Joged, Höhe 1000 m

<i>A. jesdianum</i> Boiss. et Buhse	1033	Iran 2004 Binalud Massiv nahe Kharv e Olya, Höhe 1700 m
	1082	Gatersleben Botanischer Garten Göteborg
	1178	Iran 2007 Kuh-e Garri Massiv, Tal des Kahman Flusses, oberhalb von Dareh-Tang, Höhe 1950 m
	1180	Iran 2007 Kuh-e Garri Massiv, Tal des Kahman Flusses, oberhalb von Dareh-Tang, Höhe 2100 m
	3666	Gatersleben (Usbekistan 1993) Kugitang-Gebirge, ca. 20 km westlich von Gulistan, im Tal Baglidarasai
	3671	Gatersleben (Usbekistan 1993) Kugitang-Gebirge, ca. 20 km westlich von Gulistan, im Tal Baglidarasai
<i>A. karataviense</i> Regel	4215	Usbekistan 2005 Chatkal Gebirge, oberhalb von Sukok, 50 km östlich von Tashkent, Höhe 1400 m
<i>A. komarowii</i> Lipsky	4170	Usbekistan 2003 West Hissar, bei Kaltakul, 7 km von der Straße nach Kirgalma, Höhe 1800 m
	6142	Tadschikistan 2004 Qozkhona Berg, nächster Berg östlich der Mündung des Saritag Flusses, Höhe 2500 m

<i>A. macleanii</i> J. G. Baker	2218	Gatersleben Botanischer Garten Minsk, Bulgarien
	6190	Tadschikistan 2005 Darvaz Gebirge, Tal des Sagirdasht Flusses, Tagidarai melo, Höhe 2000 m
	6201	Tadschikistan 2005 Panj Tal, an der Hauptstraße von Kalaikhumb nach Vanch, Höhe 1350 m
	6209	Tadschikistan 2005 Vanch Tal, Poi Mazor, Shavgado, Höhe 2430 m
	6211	Tadschikistan 2005 Vanch Tal, 1 km westlich von Gujovast, Tagi ovparo, Höhe 2340 m
	6217	Tadschikistan 2005 Darvaz Gebirge, Khumbov Schlucht oberhalb der dritten Brücke, Regi Ravon, Höhe 2100 m
	6240	Tadschikistan 2006 Peter I. Gebirge, Obikhingou Tal, nahe der Straße bei Lyangar, Höhe 2110 m
	6250	Tadschikistan 2006 Peter I. Gebirge, Obikhingou Tal, am Hang des Tarsher Zaga Berges, oberhalb von Arzung, Höhe 3350 m
	6252	Tadschikistan 2006 Peter I. Gebirge, Obikhingou Tal, nahe der Straße bei Alisurkhon, Höhe 2550 m
	6256	Tadschikistan 2006 Darvaz Gebirge, oberhalb. von Mionadu, bei Zaki Khirsdara, Höhe 2900 m

<i>A. motor</i> Kamelin et Levichev	4133	Usbekistan 2003 Chimgan Massiv, Aksaj und Chimgansaj, Höhe 1650 – 1980 m
<i>A. rosenbachianum</i> auct Regel	6050	Tadschikistan 2003 Höchste Region von Khodzha Mumin, in der Nähe des Pfades von Mazor, Höhe 1300 m
<i>A. rosenorum</i> R. M. Fritsch	0653	Gatersleben Privatgarten Dr.Fritsch, Deutschland
	1327	Gatersleben (Tadschikistan 1984) Siema-Tal, nördlich von Dushanbe
	1869	Gatersleben (Tadschikistan 1986) Schutzgebiet Ramit, Seitenfluß des Kafirnigan
	1894	Gatersleben (Tadschikistan 1986) Linkes Seitental des Varzob, oberhalb Kondara
	2938	Gatersleben (Tadschikistan 1990) Im Schatten von Juniperus und Acer, Aktau
	3781	Gatersleben Hoog & Dix Export, Niederlande
	4167	Usbekistan 2003 West Hissar, bei Kaltakul, 3 km von der Straße nach Tashkurgan, Höhe 1750 m
	6143	Tadschikistan 2004 2 km westlich von Saritag, linke Seite des Karakul Flusses, Höhe 2680 m
	6153	Tadschikistan 2004 Shing Tal, Westseite des dritten Kulikalon Sees von unten, Höhe 1750 m

<i>A. stipitatum</i> Regel	1076	Iran 2006 Gekauft auf dem Markt in Hamadan, soll von Assad Abad stammen
	6130	Tadschikistan 2004 Anzob Tal, nahe der Narzan Mineralquellen, Höhe 2800 m
	6215	Tadschikistan 2005 Darvaz Gebirge, Khumbov Schlucht, hinter der zweiten Brücke, Höhe 1900 m
	6253	Tadschikistan 2006 Peter I. Gebirge, Obikhingou Tal, nahe der Straße unterhalb von Lyangar, Höhe 2080 m
<i>A. winklerianum</i> Regel	6145	Tadschikistan 2004 2 km westlich von Saritag, linke Seite des Karakul Flusses, Höhe 3370 m

Tab. 2.2: Verwendetes Pflanzenmaterial (Gattung *Allium*)

<b>Spezies (<i>Hoodia</i>)</b>	<b>Spezies</b>
<i>Hoodia gordonii</i> 1 bis 3	<i>Stapelia leendertziae</i>
<i>Hoodia flavum</i>	<i>Stapelia gigantea</i>
<i>Hoodia juttae</i>	<i>Stapelia grandiflora</i>
<i>Hoodia ruschii</i>	<i>Orbea decaisneana</i>
<i>Hoodia bradei</i>	<i>Tromotriche revoluta</i>
<i>Hoodia pilifera</i>	<i>Quaqua mamilaris</i>
<i>Hoodia currorii</i>	/

Tab. 2.3: Verwendete *Hoodia* und verwandte Arten

## 2.3 Lösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden entsprechend den Tabellen 2.4 bis 2.8 hergestellt.

### 2.3.1 Lösungen und Puffer für die Precursorextraktion und für die Cysteinsulfoxiduntersuchung

Bezeichnung	Bestandteile		Herstellung
Boratpuffer pH 9,5 (0,05 M)	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>4</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	4,77 g	in 200 ml H <sub>2</sub> O lösen, pH mit 1 N NaOH auf 9,5 einstellen, H <sub>2</sub> O ad 250 ml
Derivatisierungsreagenz	ortho-Phthaldialdehyd	140 mg	Das ortho-Phthaldialdehyd in Methanol lösen, dann das Thiol hinzugeben und in kleinen Portionen den Puffer hinzufügen.
	Methanol	5 ml	
	2-Methylpropanthiol	200 µl	
	0,05 M Boratpuffer pH 9,5	50 ml	
Phosphatpuffer pH 6.5	Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	1,93 g	In 1000 ml H <sub>2</sub> O lösen, pH auf 6,5 einstellen
	di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	2,53 g	
Fließmittel DC	n-Butanol	70 ml	
	Wasser	20 ml	
	Essigsäure	22,5 ml	
	Ameisensäure	5 ml	
Ninhydrin Sprühreagenz	Ninhydrin	60 mg	
	Cobalt(II)nitrat	10 mg	
	Essigsäure	2 ml	
	n-Butanol	10 ml	
	Ameisensäure	0,25 ml	
	Collidin	1 ml	

Tab. 2.4: Puffer und Lösungen für die Cysteinsulfoxidanalytik



**2.3.2 Lösungen und Puffer für die Proteinextraktion und Untersuchung**

Bezeichnung	Bestandteile		Herstellung
APS-Lösung (20%)	Ammoniumperoxodisulfat	2 g	H <sub>2</sub> O ad 10 ml
Elektrophoresepuffer für SDS-Gel	TRIS	7,5 g	H <sub>2</sub> O ad 2500 ml
	Glycin	38,5 g	
	SDS	2,5 g	
Extraktionspuffer (Alliinase-Vollpuffer)	Phosphatpuffer pH 7,0	100 ml	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
	600 mM (10x)		
	Saccharose	100 g	
	NaCl	10 g	
Entfärbelösung für die Coomassie Färbung	Essigsäure	190 ml	H <sub>2</sub> O ad 2500 ml
	Methanol	500 ml	
Färbelösung für die Coomassie Färbung	Coomassie Blue	1 g	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
	Essigsäure	75 ml	
	Methanol	500 ml	
Folin- Gebrauchslösung	Folin-Phenol-Reagenz	1 VT	Das benötigte Volumen herstellen und zügig verwenden.
	Wasser	10 VT	
Lowry-Lösung A	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 g	H <sub>2</sub> O ad 50 ml
	NaOH	1 g	
Lowry-Lösung B	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	100 mg	H <sub>2</sub> O ad 10 ml
Lowry-Lösung C	K-Na-tartrat	200 mg	H <sub>2</sub> O ad 10 ml
Folin- Gebrauchslösung	Folin-Phenol-Reagenz	1 VT	Das benötigte Volumen herstellen und zügig verwenden.
	Wasser	10 VT	
Phosphatpuffer pH 7,0 600 mM (10x)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	177,0 g	H <sub>2</sub> O ad 5000 ml
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	362,6 g	

Sammelgelpuffer für SDS-Gel	TRIS	15,2 g	pH auf 6,8 einstellen, H <sub>2</sub> O ad 250 ml
SDS-Lösung (20%)	Natriumdodecylsulfat	2 g	H <sub>2</sub> O ad 10 ml
Silberfärbung (1) Fixierlösung	Methanol	250 ml	
	Essigsäure	60 ml	
	Formaldehyd (37%)	250 µl	
	H <sub>2</sub> O	190 ml	
Silberfärbung (2) Waschlösung 1a	Ethanol	500 ml	
	H <sub>2</sub> O	500 ml	
Silberfärbung (3) Waschlösung 1b	Ethanol	150 ml	
	H <sub>2</sub> O	350 ml	
Silberfärbung (4) Vorbehandlungslösung	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	100 mg	
	H <sub>2</sub> O	500 ml	
Silberfärbung (5) Imprägnierlösung	Silbernitrat	0,1 g	vor Gebrauch frisch herstellen
	Formaldehyd (37%)	50 ml	
	H <sub>2</sub> O	50 ml	
Silberfärbung (6) Entwickler	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	30 g	
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2 mg	
	Formaldehyd (37%)	250 µl	
	H <sub>2</sub> O	500 ml	
Silberfärbung (7) Stopplösung	Methanol	250 ml	
	Essigsäure	60 ml	
	H <sub>2</sub> O	190 ml	
Silberfärbung (8) Waschlösung 2	Methanol	500 ml	
	H <sub>2</sub> O	500 ml	
Trenngelpuffer für SDS-Gel	TRIS	45,5 g	pH auf 8,8 einstellen, H <sub>2</sub> O ad 250 ml

TRIS-Lösung pH 6,8 (1M)	TRIS-HCl	15,8 g	pH auf 6,8 einstellen, H <sub>2</sub> O ad 100 ml
Trenngelpuffer für SDS-Gel	TRIS	45,5 g	pH auf 8,8 einstellen, H <sub>2</sub> O ad 250 ml

Tab. 2.5: Puffer und Lösungen für die Proteinextraktion und -untersuchung

### 2.3.3 Lösungen und Puffer für die Gel- und Affinitätschromatographie

Bezeichnung	Bestandteile		Herstellung
ConA-Lagerpuffer	Phosphatpuffer pH 7,0	100 ml	Phosphatpuffer, 800 ml H <sub>2</sub> O und Salze zusammengeben und 5 min rühren. Filtrieren und H <sub>2</sub> O ad 1000 ml.
	600 mM (10x)		
	NaCl	58,4 g	
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	147,0 mg	
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	203,3 mg	
	MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	161,8 mg	
	P-5'-P	26,5 mg	
	Thimerosal	200 mg	
EDTA Lösung (1M)	EDTA	2,9 g	H <sub>2</sub> O ad 10 ml
Ethanol 20%	Ethanol	200 ml	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
Imidazolösung (20 mM)	Phosphatpuffer pH 7,0	100 ml	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
	600 mM (10x)		
	Imidazol	3,4 g	

Mannopyranose-Lösung	Methyl- $\alpha$ -D-Mannose		Methylmannose mit dem Phosphatpuffer mischen
0,05 M		0,97 g	
0,10 M		1,94 g	
0,15 M		2,91 g	
0,20 M		3,88 g	
0,25 M		4,85 g	
0,30 M		5,82 g	
0,40 M		7,76 g	
	Phosphatpuffer für die Gel-chromatographie	100 ml	
Nickellösung (0,2 M)	Nickelsulfat Hexahydrat	5,25 g	H <sub>2</sub> O ad 100 ml
Phosphatpuffer für Gel-Chromatographie	Phosphatpuffer pH 7,0 600 mM (10x) NaCl	100 ml  8,76 g	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
Phosphatpuffer für pH-Gradient	Phosphatpuffer für die Gel-chromatographie	100 ml	pH-Wert auf 7,8; 7,6; 7,4; 7,2; 7,0; 6,8 oder 6,6 einstellen
Phosphatpuffer pH 7,8	Phosphatpuffer pH 7,0 600 mM (10x) NaCl	100 ml  8,76 g	pH-Wert auf 7,8 einstellen, H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
Pyridoxal-5'-Phosphatlösung (10mM)	Pyridoxal-5'-Phosphat	24,7 mg	H <sub>2</sub> O ad 10 ml

Tab. 2.6: Puffer und Lösungen für die Gel- und Affinitätschromatographie

### 2.3.4 Lösungen und Puffer für die Aktivitätsbestimmungen

Bezeichnung	Bestandteile		Herstellung
Borat Lösung (0,2 M)	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	38,1 g	$\text{H}_2\text{O}$ ad 500 ml
Citronensäurelösung (0,1 M)	Citronensäure $\times \text{H}_2\text{O}$	5,25 g	$\text{H}_2\text{O}$ ad 250 ml
di-Natrium-hydrogenphosphat-Lösung (0,2 M)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	17,8 g	$\text{H}_2\text{O}$ ad 500 ml
LDH Lösung (18,5 U / 50 $\mu\text{l}$ )	LDH Suspension	150 $\mu\text{l}$	Phosphatpuffer ad 2 ml
NADH Lösung (8,5 mM)	NADH	12 mg	Phosphatpuffer ad 2 ml
Natriumdihydrogenphosphatlösung (0,2 M)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	15,6 g	$\text{H}_2\text{O}$ ad 500 ml
Natronlauge (0,2 M)	NaOH	2 g	$\text{H}_2\text{O}$ ad 250 ml
Natronlauge (0,8 M)	NaOH	3,2 g	$\text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml
Salzsäure (0,8 M)	Salzsäure (32%)	8 ml	$\text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml

Tab. 2.7: Puffer und Lösungen für die Aktivitätsbestimmungen

pH-Wert	0,1 M Citronensäure Lösung	0,2 M Hydrogenphosphat Lösung	NaCl
3,0	39,8 ml	10,2 ml	1633,7 mg
4,0	30,7 ml	19,3 ml	1515,7 mg
5,0	24,8 ml	25,7 ml	1405,4 mg
5,5	21,6 ml	28,4 ml	1359,5 mg
6,0	17,9 ml	32,1 ml	1296,5 mg
6,5	14,5 ml	35,5 ml	1194,4 mg
7,0	6,5 ml	43,6 ml	930,0 mg

pH-Wert	0,2 M Dihydrogenphosphat- Lösung	0,2 M NaOH	NaCl
6,0	50 ml	5,6 ml	1085,2 g
6,5	50 ml	13,9 ml	942,7 g
7,0	50 ml	29,1 ml	660,3 g
8,0	50 ml	46,7 ml	139,4 g
7,5	50 ml	41,1 ml	345,0 g

pH-Wert	0,2 M Borat Lösung	0,8 M HCl / 0,8 M NaOH	NaCl
7,5	50 ml	25,8 ml	1148,6 g
8,0	50 ml	20,5 ml	1104,9 g
8,5	50 ml	15,2 ml	986,3 g
9,0	50 ml	4,6 ml	736,4 g
9,5	50 ml	9,5 ml	408,8 g
10,0	50 ml	18,3 ml	169,8 g
11,0	50 ml	25,2 ml	19,5 g

Tab. 2.8: Zusammensetzung für Puffer mit definiertem pH-Wert

### 2.3.5 Verwendete Geräte

Die für diese Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.9 zusammengefasst.

Gerät	Beschreibung
HPLC-MS	Shimadzu LC 20 HPLC System, (Autosampler, Hochdruckgradienten Pumpe, Säulenofen, UV-Detektor) QTrap 2000 Massenspektrometer (Applied Biosystems) mit ESI und APCI Ionenquelle
FPLC	Pharmacia (heute GE Healthcare) FPLC System (zwei Pumpen (LKP P-500), Kontrolleinheit (LCC-500 PLUS), UV-Detektor (LKB UV1, 254 nm, mit Kontrolleinheit), Fraktionensammler (LKB FRAC-100) Schreiber)
Peristaltik Pumpe	Pharmacia P1
Photometer	Spektralphotometer UVICON® (Fa. KONTRON Spectrometers)
Polarimeter	Jas.co DIP-370 Digital Photometer
IR	Nicolet FT-IR 510 P
Mikrotiterplattenreader	MultiscanEX® (Fa. Thermo Electron Corporation) oder: Laborsystems iEMS Reader MF

Tab. 2.9: Verwendete Geräte

## **2.4 Allgemeine Vorschriften**

Im folgenden sind allgemeine Vorschriften und Einstellungen zusammengefasst, die während der Arbeit verwendet wurden.

### *Parameter der HPLC-MS- und MS/MS- Messungen*

Für die HPLC-Messungen wurde ein Merck Hitachi Model D-7000 HPLC-System verwendet. Dieses bestand aus einem Interface D-7000, einer Pumpe L-7100, einem Autosampler L-7200, einem Säulenofen L-7360 und einem UV-Detektor L-7400. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl.

Für die HPLC-MS und MS/MS-Messungen wurde ein Qtrap 2000 Massenspektrometer (Applied Biosystems) verwendet. Das Gerät kann sowohl im Triple Quadrupol- als auch im Ionenfallen-Modus betrieben werden. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Messungen im Quadropul- (MS-Messungen) oder Triple-Quadrupol (MS/MS-Messungen) Modus durchgeführt. Als Ionenquelle stand eine Elektrosprayquelle (ESI, Turbolon, Applied Biosystems) oder eine Atmospheric pressure chemical Ionisation Quelle (APCI, Applied Biosystems) zur Verfügung. Für die wiedergegebenen Messungen wurde die ESI-Ionenquelle verwendet. Die allgemeinen Einstellungen mit positiver und negativer Ionisation sind in Tabelle 2.10 wiedergegeben. Die spezifischen Einstellungen für die einzelnen Messungen können den folgenden Kapiteln entnommen werden. Der Scanbereich umfasste 30 bis 1700 amu. Zur Datenverarbeitung wurde die Analyst software (Applied Biosystems) verwendet.

Für die HPLC-MS Trennungen wurde ein Shimadzu LC 20 HPLC-System, bestehend aus Autosampler, Hochdruckgradienten Pumpe, Säulenofen und einem UV-Detektor verwendet. Als stationäre Phase diente eine Nucleodur 100-5 C18ec-Säule (250 x 2mm, 5 µm) der Firma Macherey-Nagel. Die mobile Phase bestand aus einem Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Gradienten. Das Injektionsvolumen betrug 10 bis 20 µl, die Säulentemperatur 20°C.

Alle Proben wurden vor der Injektion mit einem 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert.



positive Ionisation		negative Ionisation	
Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Auflösung	Unit	Auflösung	Unit
Curtain gas (CUR)	10	Curtain gas (CUR)	-10
Ion spray voltage	5500	Ion spray voltage	-4500
Gas 1 (nebulizer gas)	20	Gas 1 (nebulizer gas)	20
Gas 2 (turbo gas)	0	Gas 2 (turbo gas)	0
Interface heater	ON	Interface heater	ON
Declustering potential (DP)	190/80	Declustering potential (DP)	-190/-80
Entrance potential (EP)	9/10	Entrance potential (EP)	-9/-10

Tab. 2.10: Allgemeine Einstellungen der MS- und MS/MS Messungen

#### *Parameter der HR-MS und NMR Messungen*

Die HR-MS Messungen wurden an einem AutoSpec M der Firma Micromass, mit positiver Ionisation und einem Fluss von 10 µl/min durchgeführt.

Die NMR Messungen wurden an einem Bruker Avance 400 Spectrometer und einem JEOL ECA-500 sowie JEOL ECX-400 vorgenommen. Neben eindimensionalen Spektren (<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR) wurden Standard Korrelationsexperimente (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC) durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit JEOL DELTA oder mit Bruker advanced.

#### *Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Allium Extrakten*

Eine schnelle Methode der Überprüfung von *Allium*-Arten ist die Dünnschichtchromatographie. Hiermit können Sulfoxide und Aminosäuren detektiert werden [Keusgen 1997]. Die Methode wurde zur schnellen Überprüfung einzelner Extrakte verwendet.

Hierzu wurden ca. 0,5 mg bis 1 mg des gelösten Extraktes auf DC-Fertigplatten (50 mm x 10 mm, Kieselgel 60, Macherey-Nagel) aufgetragen. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus n-Butanol, Wasser, Essigsäure und Ameisensäure verwendet (Tabelle 2.4). Die Detektion erfolgte mit einem Ninhydrin-Sprühareagenz (Tabelle 2.4). Nach dem Besprühen wurden die Platten für 5 Minuten bei 110°C entwickelt und bei 254 nm betrachtet.

#### *Herstellung der synthetischen Cysteinsulfoxide*

Die synthetischen Cysteinsulfoxide wurden in der Arbeitsgruppe synthetisiert. [Keusgen 1998, Koch und Keusgen 1998]. Hierzu wurden die Alkylbromide oder Iodide mit L-Cystein im stark alkalischen Medium versetzt. Es bildeten sich zunächst die Desoxycysteinsulfoxide, die nach der Umkristallisation mit Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur oxidiert wurden. Nach der Aufreinigung durch Umkristallisation wurde die Reinheit der razemischen Cysteinsulfoxide per HPLC bestimmt.

#### *Quantitative Bestimmung der Cysteinsulfoxide nach Derivatisierung mit OPA*

Zur Quantifizierung des Pyrrolylcysteinsulfoxidgehaltes der Precursorlösungen wurde eine HPLC Methode nach Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) verwendet. Die Bestimmung basiert auf der Methode zur Bestimmung der Cysteinsulfoxide nach Ziegler und Sticher [1989], in der Modifikation nach Kusterer und Keusgen [unveröffentlichte Daten]. Hierzu wurde die Probe in 5 ml des OPA-Derivatisierungsreagenzes gelöst und 50 µl 2-Methyl-2-propanthiollösung hinzugegeben (Tabelle 2.4). Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Probe per HPLC vermessen werden. Zunächst wurden sie hierfür 1:5 mit OPA-Reagenz verdünnt. Als Säule wurde eine Nucleodur 100-5 C18ec-Säule (250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) verwendet. Die Fließmittelbedingungen sind in Tabelle 2.11 wiedergegeben. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Die Detektion erfolgte UV-photometrisch bei 335 nm.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	CH <sub>3</sub> CN [%]	Phosphatpuffer [%]
00,0	1	22	78
20,0	1	22	78
49,0	1	25	75
50,0	1	25	75
54,0	1	29	71
55,0	1	29	71
63,0	1	32	68
65,0	1	37	63
70,0	1	37	63
70,1	1	22	78
75,0	1	22	78

Tab 2.11: Fließmittelgradient der quantitativen HPLC der OPA Derivate

### Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden vor den chromatographischen Trennungen filtriert (0,45 µm). Nach dem jeweiligen Aufreinigungsschritt erfolgte eine Aufkonzentrierung. Hierzu wurden Amicon Filtertubes (Millipore, 30 kDa Ausschlussvolumen, Volumen 15 ml, 2000 rpm) verwendet. Die Lösungen wurden zur Stabilisierung mit 10 µl einer 10 mM Pyridoxal-5'-Phosphatlösung pro Milliliter Enzymlösung versetzt.

## 2.5 Isolierung des Farbstoff-Precursors

Zur Erlangung eines näheren Verständnisses der biochemischen Prozesse, die zur Ausbildung des roten Farbstoffes führen, sollte die Vorläufersubstanz isoliert werden.

### 2.5.1 Darstellung der enzyminaktivierten Rohextrakte

Zunächst wurden die frischen Zwiebeln (10,5 g Frischgewicht, *A. rosenorum*) geschält und vom Schmutz befreit. Im Anschluss erfolgte die sofortige Homogenisierung unter flüssigem Stickstoff. Das Homogenisat wurde dreimal für drei bis vier Stunden mit Methanol extrahiert. Damit konnten die durch den flüssigen Stickstoff kurzzeitig inaktivierten Enzyme weiter inaktiviert und teilweise denaturiert werden. Die eigentliche Extraktion erfolgte danach dreimal für drei bis vier Stunden mit Wasser. Die komplette Aufarbeitung wurde bei 4°C durchgeführt. Die vereinigten Wasserfraktionen wurden lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

### 2.5.2 Aufreinigung der Rohextrakte durch HPLC

Zur Überprüfung des Rohextraktes wurde zunächst eine analytische HPLC-Trennung durchgeführt. Hierzu wurde eine Lichrosphere 60 RP Select B (250x4 mm, 5 µm) der Firma Merck und ein Methanol/Wasser Gradient verwendet (Tab. 2.12). Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektion bei 200 nm und 254 nm. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	H <sub>2</sub> O [%]	MeOH [%]
0	0,7	100	0
10	0,7	100	0
50	0,7	5	95
70	0,7	5	95
80	0,7	100	0
100	0,7	100	0

Tab.2.12: Fließmittelgradient der analytischen HPLC zur Überprüfung der Extrakte

Die weitere Aufreinigung aus den Rohextrakten erfolgte mittels präparativer HPLC an einer RP-Säule mit einem Methanol/Wasser Gradienten. Hierzu wurden die lyophilisierten wässrigen Extrakte in Wasser rückgelöst. Für die präparative HPLC diente eine Lichrospher RP Select B Säule (250 x 25 mm i.d., 5 µm, Merck). Der Fließmittelgradient ist in Tabelle 2.13 zusammengefasst. Die Detektion erfolgte UV-photometrisch bei 254 nm und 200 nm.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	H <sub>2</sub> O [%]	MeOH [%]
0	27	100	0
15	27	100	0
25	39	5	95
40	39	5	95

Tab. 2.13: Fließmittelgradient der präparativen HPLC zur Aufreinigung der Vorläufersubstanz

Die einzelnen Peaks wurden fraktioniert gesammelt, einzeln am Rotationsverdampfer bei möglichst niedrigen Temperaturen eingengt und bei –20°C gelagert.

Die Überprüfung der Reinheit der einzelnen Fraktionen erfolgte zunächst durch die oben angegebene analytische HPLC Methode.

### 2.5.3 Überprüfung der Aufreinigung mittels Massenspektrometrie

Der Farbstoffvorläufer sollte weiterhin mittels massenspektrometrischer Messungen untersucht werden. Hierzu wurden zunächst MS/MS-Experimente (pos. Ionisierung, m/z 203) durchgeführt, um nähere Informationen über die Struktur des Precursors zu erlangen. Die Injektion der Probe erfolgte direkt mit einer Spritzenpumpe (10 µl/min). Die allgemeinen Einstellungen können Tabelle 2.10 entnommen werden. Die substanzspezifischen Einstellungen sind in Tabelle 2.14 wiedergegeben.

Parameter	Einstellung
Collision Activated Dissociation Gas (CAD)	3
Cell entrance potential (CEP)	14,03
Collision energy (CE)	15
Cell exit potential (CXP)	3
Temperatur (Quelle)	0

Tab. 2.14: Einstellungen der MS/MS Messungen zum Farbstoff Precursor

Zur Untersuchung der Probe wurden zusätzlich HPLC-MS-Messungen durchgeführt. Die Fließmittelbedingungen sind in Tabelle 2.15 zusammengefasst, die Fließgeschwindigkeit betrug 0,15 ml/min.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	H <sub>2</sub> O [%]	MeOH [%]
0	0,15	95	5
55	0,15	5	95
65	0,15	5	95

Tab. 2.15: Fließmittelgradient HPLC-MS

Die Auswertung erfolgte mittels massenspektrometrischer- und UV-Detektion bei 254 nm und 515 nm. 515 nm entsprach dem Absorptions-Maximum des roten Farbstoffes. Eine mögliche Umsetzung des Precursors in den Farbstoff während der Lagerung und Verarbeitung konnte so ausgeschlossen werden. Die Einstellungen des Massenspektrometers (Quadrupol 1) können Tabelle 2.10 entnommen werden.

### 2.5.4 Bestimmung der optischen Rotation

Die Bestimmung der optischen Rotation erfolgte mit einem Jas.co DIP-370 Digital Photometer bei 589 nm und 20°C. Die Probe wurde in Wasser gelöst (5,4 mM), die Messung erfolgte gegen Wasser.

Zur Berechnung der optischen Rotation wurde die Formel in Abbildung 2.1 verwendet.

$$[\alpha]_d^{20} = \frac{\alpha}{d \cdot c}$$

mit

$[\alpha]_d^{20}$  optische Rotation bei 20°C

$\alpha$  Drehungswinkel

$d$  Länge des Polarimeters in dm (1dm)

$c$  Konzentration des Substrates in g/ml (0,011 g/ml)

Abb. 2.1: Formel zur Berechnung der optischen Rotation

## 2.6 Proteinextraktion und -bestimmung

Zur Erweiterung des Verständnisses der biochemischen Prozesse in der Pflanze mussten weitere Informationen über das an der Ausbildung des Farbstoffes beteiligte Enzym gewonnen werden. Über dieses Enzym sind bisher wenig Informationen bekannt. Zur Aufreinigung waren daher einige Vorversuche notwendig.

### 2.6.1 Proteinextraktion

Die Extraktion der Proteine fand bei 4°C statt. Für die Herstellung der Rohproteinextrakte wurden 1-5 g der Zwiebeln gesäubert und zerkleinert, dann mit Mörser und Pistill mit Seesand in dem Extraktionspuffer (Tabelle 2.5) homogenisiert (ca. 2,5 ml Puffer pro 1 g Zwiebel). Im Anschluss wurden die Suspensionen für 60 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Dialyse des klaren Überstandes erfolgte in einem Dialyseschlauch (Sevapor, Durchmesser 21 mm, Fa. SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) für 12 bis 16 Stunden gegen den Extraktionspuffer. Der Puffer

sollte hierbei mindestens zweimal gewechselt werden. Das Dialysat wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung in Fraktionen à 1,5 bis 2,0 ml bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Für die Aufreinigung des Enzyms konnten auch bis zu 10 bis 25 g frisches Zwiebelmaterial in einer Aufarbeitung verwendet werden.

### **2.6.2 Optischer Schnelltest auf enzymatische Aktivität**

Zum Test auf Enzymaktivität wurden in einer Mikrotiterplatte 100  $\mu\text{l}$  der zu testenden Lösungen mit dem enzyminaktivierten niedermolekularen Extrakt (ca. 50 mg Lyophilisat / ml, Kapitel 2.5.1) versetzt. Eine schnell auftretende rote Verfärbung zeigte Enzymaktivität an.

Als Test auf die Polyphenoloxidase-Aktivität konnte statt dem niedermolekularen Extrakt auch eine Brenzcatechinlösung (1 mol/l) verwendet werden. Enzymatische Aktivität wurde durch eine schnell auftretende braune Verfärbung angezeigt.

### **2.6.3 Proteinmengenbestimmung nach Lowry und Bradford**

Die Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe konnte nach zwei Methoden erfolgen. Bei der Methode nach Bradford [1976] oder Lowry [1951] erfolgte der quantitative Nachweis des Proteingehaltes anhand von Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien. Die Intensität des Farbstoffes korrelierte direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen und konnte photometrisch bestimmt werden.

Für beide Methoden wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Probe hergestellt. Die Verdünnung der Proben erfolgte hierzu in der Regel 5-fach, 10-fach, 20-fach und 50-fach.

Bei der Erstellung der Kalibriergeraden diente Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin) als Standard. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 1 mg/ml. Für die Bestimmung nach Lowry wurden 10, 20, 30, ..., 100  $\mu\text{l}$  BSA-Stammlösung, für die Bestimmung nach Bradford 5, 10, 15, ..., 50  $\mu\text{l}$  BSA-Stammlösung auf 100  $\mu\text{l}$  mit Wasser verdünnt.

Die Messungen erfolgten in einem Küvettensystem in einem UV-Photometer oder in einem Mikrotiterplattensystem in einem Mikrotiterplatten-Reader. Für die Bestimmung nach Lowry konnte jeweils auch die unverdünnte Probe verwendet werden.



### ***Bradford-Test***

Für das Küvettensystem wurden jeweils 100 µl der Verdünnungsreihen in eine Küvette pipettiert. Zwei weitere Küvetten mit je 100 µl Wasser dienten als Blindproben. Zu den Proben, Standards und Blindwerten wurden jeweils zusätzlich 900 µl Bradford-Lösung (Tabelle 2.5) gegeben und gut durchmischt.

Für den Mikrotiterplattentest wurden 25 µl der Proben und der Standards sowie 25 µl Wasser als Blindprobe in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wurden 225 µl Bradford-Lösung gegeben und ebenfalls gut durchmischt.

In beiden Methoden konnte nach mindestens 10 Minuten die Absorption bei 595 nm bestimmt werden.

### ***Lowry-Test***

Auch hier wurden jeweils 100 µl der verdünnten Proben oder Standards, bzw. Wasser in die Küvetten gegeben. Dazu wurden je 335 µl Lowry-Gebrauchslösung (Tabelle 2.5) pipettiert und sofort gut durchmischt. Nach genau 15 Minuten wurde je 1 ml Folin-Gebrauchslösung (Tabelle 2.5) hinzugegeben und erneut gut durchmischt. Die spektralphotometrische Vermessung der Lösungen erfolgte nach weiteren 45 Minuten bei 540 nm.

Die Bestimmung mit einem Mikrotiterplattenreader erfolgte analog unter den genauen Zeitvorgaben. Hierbei wurden je 20 µl der Verdünnungen, bzw. Wasser, 70 µl Lowry-Gebrauchslösung und 200 µl Folin-Gebrauchslösung verwendet.

Die gemessenen Absorptionen der Verdünnungsreihe wurden gegen die Proteinmenge (mg/ml) graphisch aufgetragen und die Regressionsgerade bestimmt. Durch Einsetzen der Probenmesswerte in die Regressionsgleichung konnte unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung die Proteinkonzentration in der Probe berechnet werden.

### ***2.6.4 Proteingelanalytik***

Die Proteinanalyse verschiedener *Allium*-Proben erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelen nach Lämmli et al. [1970]. Hierzu konnte eine Kammer für die vertikale Gelelektrophorese (Thermo Mini vertical gel system (EC 120)) mit einem Spannungsgeber verwendet werden. Die Abmessung der Gele betrug 70 mm x 80 mm x 0,5 mm. Als Molekulargewichtsstandard wurde sowohl der „Low Molecular Weight

Range SigmaMarker“ (Fa. Sigma-Aldrich, Saint Louis) als auch „Roti-Mark Standard“ (Roth, Karlsruhe) verwendet. Die in diesen Markern enthaltenen Proteine und ihr Molekulargewicht sind in Tabelle 2.16 zusammengefasst.

Low Molecular Weight Range SigmaMarker™		Roti®-Mark STANDARD	
Protein	MW [kDa]	Protein	MW [kDa]
Albumin, Rinderserum	66,0	Myosin, Rind	200,0
Ovalbumin, Hühnerei	45,0	$\beta$ -Galactosidase, rek <i>E.coli</i>	119,0
Glyceraldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase, Kaninchenmuskel	36,0	Serumalbumin, Rind	66,0
Carboanhydrase, Rindererythrocyten	29,0	Ovalbumin	43,0
Trypsinogen, Rinderpankreas	24,0	Carboanhydrase	29,0
Trypsininhibitor, Sojabohne	20,0	Trypsin Inhibitor, Soja	20,0
$\alpha$ -Lactalbumin, Milch	14,2	Lysozym, Huhn	14,5
Aprotinin, Rinderlunge	6,5	/	/

Tab. 2.16: Zusammensetzung des verwendeten Molekulargewichtsstandard mit dem zugehörigen Molekulargewicht (MW) in kDa

Eine gründliche Reinigung der Glasplatten für die Gelschablone erfolgte mit Aceton zur Entfernung von eventuellen Fettrückständen, während die selbstklebenden Abstandshalter kurz mit wenig Ethanol gewaschen wurden. Die Glasplatten mit den Abstandhaltern wurden in die Gieß-Apparatur eingespannt und fixiert.

Zunächst erfolgte die Herstellung des 12,5-prozentigen Trenngels. Die hierzu erforderlichen Reagenzien sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Die Bestandteile (Tab. 2.17) wurden in einem Becherglas vorsichtig vermischt, um wenig Sauerstoff einzutragen. Die Lösung wurde zügig zwischen die vorbereiteten Platten gegossen und

sofort vorsichtig mit wenig Butanol überschichtet. Dies gewährleistete eine glatte Oberfläche des Gels.

Trenngel 12,5%		Sammelgel	
2,5 ml	Acrylamid-Lösung 40%	310 µl	Acrylamid-Lösung 40%
2,3 ml	Trenngelpuffer pH 8,8	640 µl	Sammelgelpuffer pH 6,8
190 µl	SDS-Lösung 20%	50 µl	SDS-Lösung 20%
3,0 ml	H <sub>2</sub> O	1,5 ml	H <sub>2</sub> O
16 µl	TEMED	16 µl	TEMED
35 µl	APS-Lösung 20%	35 µl	APS-Lösung 20%

Tab. 2.17: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel (vgl. Tabelle 2.4)

APS (Ammoniumperoxodisulfat) diente als Radikalstarter, da es in Wasser freie Radikale bildet. Diese freien Radikale reagierten mit Acrylamid unter Übertragung des Radikals. Das so entstehende „aktivierte“ Acrylamid konnte in gleicher Weise mit weiteren Acrylamid-Molekülen reagieren. Dabei entstand eine lange Polyacrylamid-Kette. N,N'-Methylenbis(acrylamid) reagierte analog und führte so zur Quervernetzung der Polyacrylamid-Kette. TEMED wurde als Katalysator zugegeben, da es stabile freie Radikale bildet. Die Polymerisation war nach etwa 45 Minuten abgeschlossen.

Nach der vollständigen Polymerisation des Gels und der Entfernung des Butanols wurde der Taschenkamm zur Formung der Probestaschen in die Schablone eingesetzt.

Die für die Herstellung des Sammelgels erforderlichen Reagenzien sind in Tabelle 2.17 zusammengefasst. Nach vorsichtigem durchmischen wurde die Lösung luftblasenfrei mit einer Pipette in die Schablone gegeben, bis diese bis zum Rand der Platten gefüllt war. Nach ca. 45 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen. Das fertige Gel konnte direkt zur Elektrophorese verwendet oder für 24 Stunden bei 4°C gelagert werden.

Zur Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese wurden die gewünschten Proteinkonzentrationen (2 bis 50 µg Protein) mit einem Drittel des Volumens an

Probenpuffer (Roti-Load 1, Fa. Roth, Karlsruhe) versetzt und gut durchmischt. Die Denaturierung erfolgte durch Erhitzen für 10 Minuten im siedenden Wasserbad.

Die fertigen, polymerisierten Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und Elektrophoresepuffer (Tabelle 2.5) zugegeben. Zum Entfernen von eventuellen Gelresten konnten die Probenkammern mit Elektrophoresepuffer gespült und im Anschluss die Proben und die Standards aufgetragen werden. Das Probenvolumen betrug 10 µl bis 30 µl und 10 µl des Standards. Der Standard wurde rechts und links von den eigentlichen Proben aufgetragen, um ein mögliches ungleichmäßiges Laufen des Gels auszugleichen.

Die Elektrophorese wurde bei 25 mA und 600 V durchgeführt (Spannungsgeber PS 600, Fa. DESAGA Sarstedt-Gruppe). Nach Beendigung der Elektrophorese sollten die Gele möglichst schnell weiterverarbeitet werden. Ohne eine Fixierung der Proteine in dem Gel durch die Anfärbung konnte es zu Diffusion kommen.

Für die Detektion der Proteinbanden standen zwei verschiedene Methoden zur Anfärbung zur Verfügung, Coomassie-Färbung und die Silberfärbung. Die Coomassie-Färbung war einfacher und kostengünstiger als Silberfärbung, aber auch weniger empfindlich. Mit der Silberfärbung konnten noch Proteinmengen im Nanogramm-Bereich detektiert werden. Standardmäßig wurden die Gele mit Coomassie angefärbt, die Silberfärbung wurde eingesetzt um die Reinheit der einzelnen Fraktionen bei der Aufreinigung des Gels zu kontrollieren.

#### *Coomassie-Färbung:*

Das Gel wurde mit Coomassie-Färbelösung (Tabelle 2.5) versetzt bis es gut bedeckt war und ca. 1 Stunde vorsichtig geschüttelt. Im Anschluss wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung (Tabelle 2.5) ersetzt und diese bis zur vollständigen Entfärbung mehrfach gewechselt. Die verwendeten Entfärbelösungen konnten gesammelt und regeneriert werden. Hierzu wurde zu der Lösung Aktivkohle gegeben und gut durchmischt. Die Aktivkohle absorbierte den in der Lösung enthaltenen Coomassie-Farbstoff. Nach Filtration zur Entfernung der Aktivkohle konnte die Lösung erneut verwendet werden.

*Silberfärbung:*

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Blum et al. [1987], mit einer Modifizierung nach Peters [1997]. Die Gele wurden gemäß Tabelle 2.18 mit den Lösungen bedeckt und für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert.

Lösung	Behandlungsdauer
Fixierlösung	~ 1 Stunde
Waschlösung 1 a	2 * 20 min
Waschlösung 1 b	20 min
Vorbehandlungslösung	1 min
Wasser	3 * 20 s
Imprägnierlösung	20 min
Wasser	2 * 20 s
Entwickler	bis zum Erscheinen der Banden
Wasser	2 * 20 s
Stopplösung	10 min
Waschlösung 2	mind. 10 min

Tab. 2.18: Silberfärbung von Proteingelen

Die Gele konnten im Anschluss für einige Tage in der Waschlösung bei 4°C gelagert werden. Hierbei reduzierte sich die Größe des Geles. Zur Wiederherstellung konnten diese in 30-prozentigem Methanol für 30 Minuten und im Anschluss in 3-prozentigem Glycerol geschwenkt werden.

Die Auswertung der Gele erfolgte durch Vergleich der Laufstrecke der Proteinbanden im Verhältnis zu dem mit aufgetragenem Molekulargewichtsmarker. Auf diese Weise ließ sich das Molekulargewicht der Proteinbanden bestimmen.

## **2.7 Enzymaufreinigung**

Für die Aufreinigung des Enzyms wurde eine Kombination aus Gelchromatographie und verschiedenen Arten der Affinitätschromatographie verwendet.

### **2.7.1 Gelchromatographie**

Als erster Schritt der Aufreinigung wurde eine Gelchromatographie an einer Superose12-Säule (300 x 15 mm) durchgeführt. Das hierzu verwendete FPLC-System stammte von Pharmacia (jetzt GE Healthcare, Tabelle 2.8). Nach der Konditionierung der Säule wurden 500 µl der Proteinextrakte aufgetragen und mit Phosphatpuffer (60 mM, 0,15 M NaCl, Tabelle 2.5) eluiert. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min, es wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt. Nach der Bestimmung der aktiven Fraktionen (Kapitel 2.6.2) wurden die aktiven Fraktionen vereinigt und mit Amicon Filtertubes konzentriert (Kapitel 2.4).

Analoge Ergebnisse konnten durch ein zweistufiges System erreicht werden. Hier wurde zunächst eine Gelfiltration an einer Sephadex G25-Säule (110 x 26 mm, GE Healthcare) durchgeführt. Als Elutionsmittel diente Phosphatpuffer (60 mM mit 0,15 M NaCl, Tab. 2.6). Die Flussrate betrug 2 ml/min. Die gesammelten Fraktionen von 2 ml wurden auf Aktivität getestet (Kapitel 2.6.2) und die aktiven Fraktionen vereinigt und konzentriert. Diese Konzentrate wurden mit einer Fractogel TSK-HW-55(S)-Säule (530 x 20 mm, Merck) weiter aufgereinigt. Als Puffer diente ebenfalls der Phosphatpuffer aus Tabelle 2.6 (60 mM mit 0,15 M NaCl). Die Flussrate betrug 2 ml/min. Die aktiven Fraktionen (je 2 ml) wurden vereinigt und konzentriert. Die Kontrolle der Ergebnisse der Aufreinigung erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.4). Die Lagerung der Säulen für die Gelchromatographie erfolgte in 20% Ethanol bei Raumtemperatur.

### **2.7.2 Affinitätschromatographie an einer Con A Säule**

Die weitere Aufbereitung der aktiven Fraktionen erfolgte mit einer Affinitätschromatographie an einer Con A-Lektin-Säule. Hierzu wurde eine Säule mit an Agarose immobilisiertem Lektin Concanavalin A (Con A) (35 x 5 mm, Sigma oder GE Healthcare) verwendet. Es handelt sich um ein Lektin aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*), das im Gegensatz zu vielen anderen Lektinen selbst kein Glykoprotein ist. Es besteht aus homomeren Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 26 kDa und liegt bei pH-Werten über 7 überwiegend als Tetramer vor, unterhalb von pH 5,5 als

Dimer [Senear und Teller 1981]. Jedes Monomer verfügt über eine Kohlenhydratbindungsstelle, für deren Funktion je ein  $\text{Ca}^{2+}$  und ein  $\text{Mn}^{2+}$  Ion notwendig ist [Cunningham et al. 1975, Jack et al. 1971]. Con A bindet spezifisch an  $\alpha$ -D-Mannose- und  $\alpha$ -D-Glucose-haltige Kohlenhydrate mit hoher Affinität, aber auch an andere Zucker mit geringerer Affinität [Kanellopoulos et al. 1996]. Die Bindung an Mannose ist hierbei stärker als an Glucose, an oligo- und polymere Kohlenhydrate stärker als an Monomere. Hier erfolgt die Bindung bevorzugt an den Kettenenden [Goldstein et al. 1965].

Nach der Konditionierung der Säule mit Phosphatpuffer (60 mM, 0,15 M NaCl, Tabelle 2.6) konnten 500  $\mu\text{l}$  des teilweise gereinigten Extraktes aufgegeben werden. Die Säule wurde mit dem Phosphatpuffer gespült, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Andere schwächer gebundene Glykoproteine, wie z.B. Alliinase, konnten mit einer 0,2 M  $\alpha$ -Methylmannoselösung (Tabelle 2.6) entfernt werden; die Elution des gesuchten Proteins erfolgte mit einer 0,4 M  $\alpha$ -Methylmannoselösung (Tabelle 2.5). Die Flussrate betrug zum Auftragen des Proteins 0,5 ml/min, zum Spülen und zur Elution 1 bis 1,5 ml/min. Die Säule wurde zuerst mit dem Phosphatpuffer, dann mit Con A-Lagerpuffer (Tabelle 2.6) gespült und konnte in dem Lagerpuffer bei 4°C gelagert werden. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit Amicon Filtertubes konzentriert (Kapitel 2.4). Die Ergebnisse der Aufreinigung konnten mittels SDS-Gelelektrophorese kontrolliert werden (Kapitel 2.6.4).

### **2.7.3 Affinitätschromatographie an einer Nickelsäule**

Zur weiteren Aufreinigung nach der Gelchromatographie konnte außerdem eine Nickelsäule genutzt werden. Hierzu wurden Nickel-HisTrap Säulen (5 ml, GE Healthcare) verwendet. Die Rekonditionierung der Säulen erfolgte zunächst mit einer 0,2 M Nickellösung (Tabelle 2.6), dann wurde mit Phosphatpuffer (60 mM, pH 7,8, Tabelle 2.6) equilibriert. Die aktiven Fraktionen (500  $\mu\text{l}$ ) wurden zunächst mit dem Phosphatpuffer verdünnt und auf die Säule aufgegeben. Nach Spülen mit dem Puffer zum Entfernen von nicht gebundenem Protein, konnte das Enzym auf zwei verschiedene Arten eluiert werden. Zum einen wurde ein imidazolhaltiger Puffer eingesetzt (Tabelle 2.6). Eine Elution war allerdings auch mit einem schrittweisen pH-Gradienten möglich. Die hierzu verwendeten Phosphatpuffer hatten einen pH-Wert von 7,8; 7,6; 7,4; 7,2; 7,0; 6,8 und 6,6 (Tabelle 2.6). Das gesuchte Protein eluierte bei einem pH-Wert von 7,2 bis 7,0. Die Fließgeschwindigkeit betrug für die Auftragung der

Probe 0,5 ml/min, für Spülen und Elution 1,0 bis 1,5 ml/min. Die gesammelten Fraktionen wurden auf ihre Aktivität getestet (Kapitel 2.6.2), aktive Fraktionen vereinigt und konzentriert (Kapitel 2.4). Die Ergebnisse konnten mittels SDS Gelelektrophorese kontrolliert werden (Kapitel 2.6.4). Die Aufreinigung mit dem pH-Gradienten führte zu Fraktionen mit einer höheren Reinheit als die Elution mit Imidazolpuffer.

#### **2.7.4 Affinitätschromatographie an einer *Lens culinaris*-Lektin-Säule**

Die aktiven Fraktionen der Gelchromatographie oder der Nickel-Affinitätschromatographie konnten über eine *Lens culinaris*-Lektin-Säule weiter aufgereinigt werden. Hierzu wurde eine Säule mit an Sepharose immobilisiertem *Lens culinaris*-Lektin verwendet (35 x 5 mm, Sigma). Die Konditionierung der Säule erfolgte mit einem Phosphatpuffer (60 mM, pH 7,8, Tabelle 2.6). Die Probe (500 µl) wurde in diesem Puffer verdünnt und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule gegeben. Ungebundene Proteine konnten durch Spülen mit Phosphatpuffer entfernt werden. Die Elution erfolgte mit einem  $\alpha$ -Methylmannosegradienten. Hierzu wurden Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,4 M verwendet (Tabelle 2.6). Spülen und Elution erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,0 bis 1,5 ml/min. Die gesammelten Fraktionen wurden auf ihre Aktivität getestet (Kapitel 2.6.2), aktive Fraktionen vereinigt und konzentriert (Kapitel 2.4). Die Kontrolle der Ergebnisse erfolgte mittels SDS Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.4).

### **2.8 Aktivitätsbestimmungen**

Für das isolierte Protein wurde die Enzymaktivität für die Alliinase-ähnliche wie auch für die Polyphenoloxidase-Aktivität bestimmt. Zusätzlich wurde als Summenparameter die Aktivität für die Farbstoffbildung ermittelt. Zur Charakterisierung des Enzyms wurden für alle drei Bestimmungen das pH- und Temperaturoptimum sowie die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  bestimmt. Für die Alliinase-ähnliche und die Polyphenoloxidase-Aktivität sollte zusätzlich die Substratspezifität und die Hemmung der katalytischen Aktivität ermittelt werden.



### 2.8.1 Bestimmung der Enzymaktivität der Alliinase-ähnlichen Funktion

Die Alliinase-ähnliche Aktivität konnte über ein photometrisches System bestimmt werden. Hierzu wurde ein Mikrotiterplattenreader verwendet.

Pyruvat, das bei der Umsetzung des Cysteinsulfoxides entsteht, reagiert in diesem System durch Laktatdehydrogenase (LDH) weiter zu Laktat (Abb. 2.2). Diese Reaktion ist abhängig von NADH als Cofaktor. Der NADH Verbrauch ist proportional zu der Menge des umgesetzten Cysteinsulfoxides und kann photometrisch bei 340 nm beobachtet werden. Um sicherzustellen, dass die Alliinase-ähnliche Aktivität des Enzyms der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dieser Reaktion ist, wird LDH in einer höheren Konzentration als das unbekannte Enzym zugegeben.

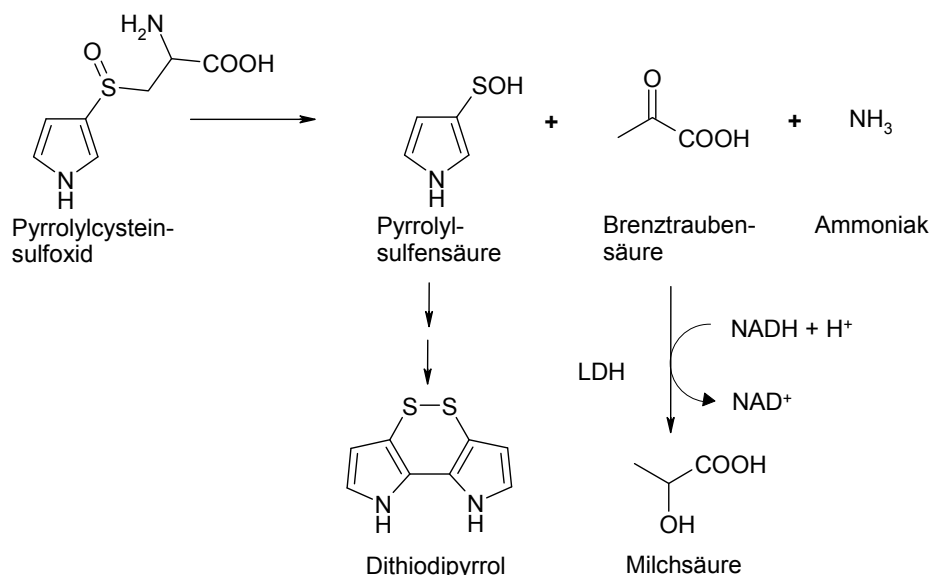


Abb. 2.2: Alliinase-ähnliche und LDH Reaktion

Hierzu wurden zu jeweils 80 µl Phosphatpuffer 5 µl NADH-Lösung (Endkonzentration 400 µM), 5 µl LDH-Lösung (308 nkat) und 5 µl der Probe pipettiert (Tabelle 2.6). Zu den Proben wurden 10 µl einer Pyrrolylcysteinsulfoxidlösung (Konzentration 268 µM), in die Blindlösungen 10 µl Puffer gegeben. Nach 10 Sekunden schütteln der Platten im Gerät, konnten sie im Anschluss bei 340 nm vermessen werden. Hierbei wurde alle 5 Sekunden ein Messwert aufgenommen.

Die Enzymaktivität ließ sich demnach abgeleitet vom Lambert-Beer'schen Gesetz nach der Formel in Abb. 2.3 berechnen.

$$A_S = \frac{VF \cdot V_K}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P \cdot C_{Prot}} \cdot m \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right]$$

mit:

VF     Verdünnungsfaktor der Probe

V<sub>K</sub>     Volumen (hier: 0,105 ml)

ε     molarer Extinktionskoeffizient (hier: für NADH bei 340 nm 6,22 cm<sup>2</sup>/μmol)

d     Schichtdicke in der Mikrotiterplatte (0,3 cm)

V<sub>P</sub>     eingesetztes Probenvolumen in ml (0,01 ml)

C<sub>Prot</sub>     Proteinkonzentration [mg/ml]

M     Steigung der Geraden durch die Anfangssteigung

Abb. 2.3: Formel zur Berechnung der Enzymaktivität

Die Umrechnung der Aktivität von μmol \* min<sup>-1</sup> \* mg<sup>-1</sup> (U \* mg<sup>-1</sup>) in nkat \* mg<sup>-1</sup> erfolgt durch Multiplikation mit dem Faktor 16,67.

### 2.8.2 Bestimmung des pH-Optimums

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde der Puffer für die Aktivitätsbestimmung nach Kapitel 2.6.1 variiert. Hierzu dienten verschiedene Puffer zwischen pH 3 und pH 11. Zunächst wurden drei verschiedene Puffersysteme getestet (Citratpuffer für saure pH-Werte, Phosphatpuffer für neutrale pH-Werte und Boratpuffer für basische pH-Werte, Tabelle 2.8). Da sich beim Wechsel der Puffersysteme große Aktivitätsschwankungen ergaben, wurde der gesamte pH-Bereich zusätzlich mit einem Phosphatpuffer vermessen (Tabelle 2.9).

### 2.8.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Die Bestimmung des Temperatur-Optimums erfolgte nach der in Kapitel 2.8.1 beschriebenen Aktivitätsbestimmung. Die Temperatur des Mikrotiterplattenreaders wurde eingestellt und die Lösungen vor der Zugabe des jeweiligen Substrates inkubiert. Nach der Überprüfung der Temperatur der Lösungen mit einem Thermometer, konnte die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet werden. Es

wurde die Aktivität bei 18,0; 20,0; 22,5; 25,0; 27,5; 30,0; 32,0; 34,0; 36,0, 38,0 und 40,0°C bestimmt.

### 2.8.4 Michaelis-Menten Kinetik

Eine durch ein Enzym katalysierte Reaktionsgleichung wird wie in Abb. 2.4 wiedergegeben dargestellt.

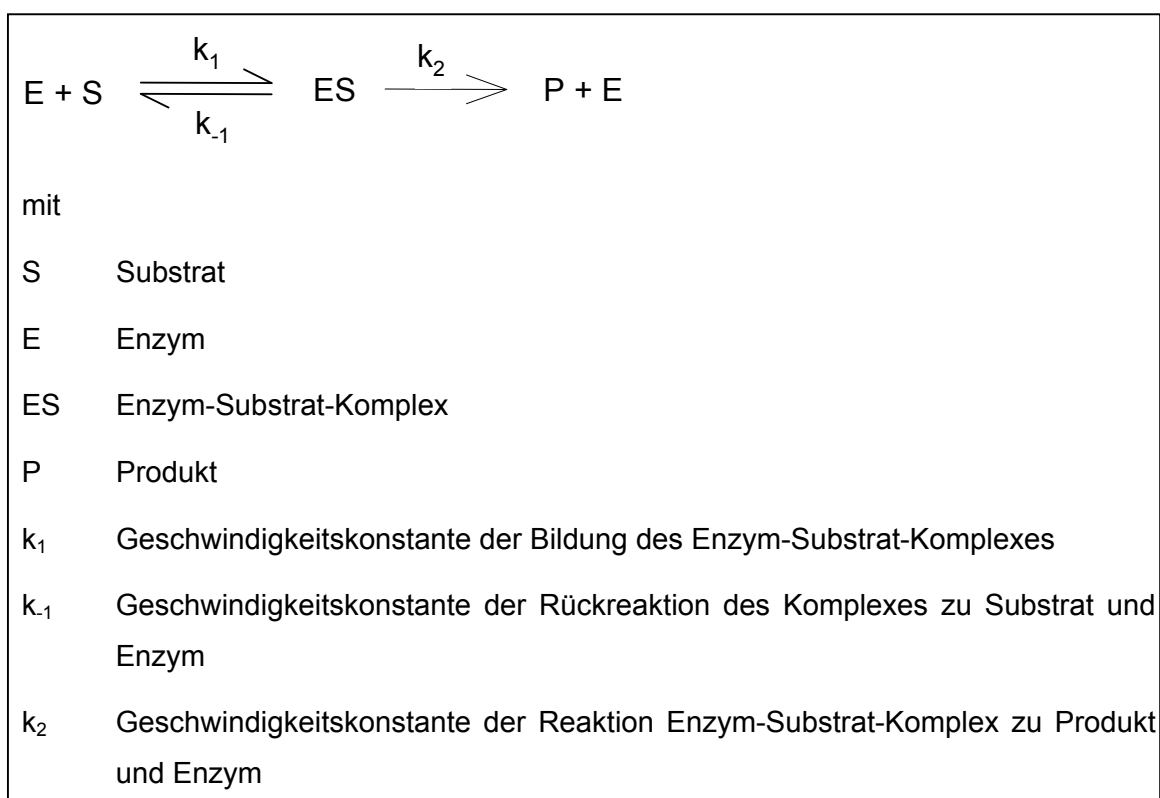


Abb. 2.4: Reaktionsgleichung einer Enzym katalysierten Reaktion

Diese Formel kann durch die Bildung der Michaelis-Menten Konstante ( $K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$ ) und der maximalen Geschwindigkeit ( $V_{\max} = k_2 [E_{\text{ges}}]$ ) vereinfacht werden. Hieraus ergibt sich die Michaelis-Menten Gleichung für die substratkonzentrationsabhängige Reaktionsgeschwindigkeit V (Abb. 2.5).

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Abb. 2.5: Michaelis-Menten Gleichung

Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität für verschiedene Substratkonzentrationen ergibt sich der in Abb. 2.6 dargestellte Kurvenverlauf. Mit steigender Substratkonzentration nimmt die Geschwindigkeit der Reaktion immer weiter zu, bis schließlich eine Sättigungskonzentration erreicht ist. Hier ist keine Steigerung der Geschwindigkeit durch eine Erhöhung der Substratkonzentration mehr zu erreichen. Der  $K_m$ -Wert gibt die Konzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit wieder,  $V_{\max}$  die maximale Geschwindigkeit, die erreicht werden kann.

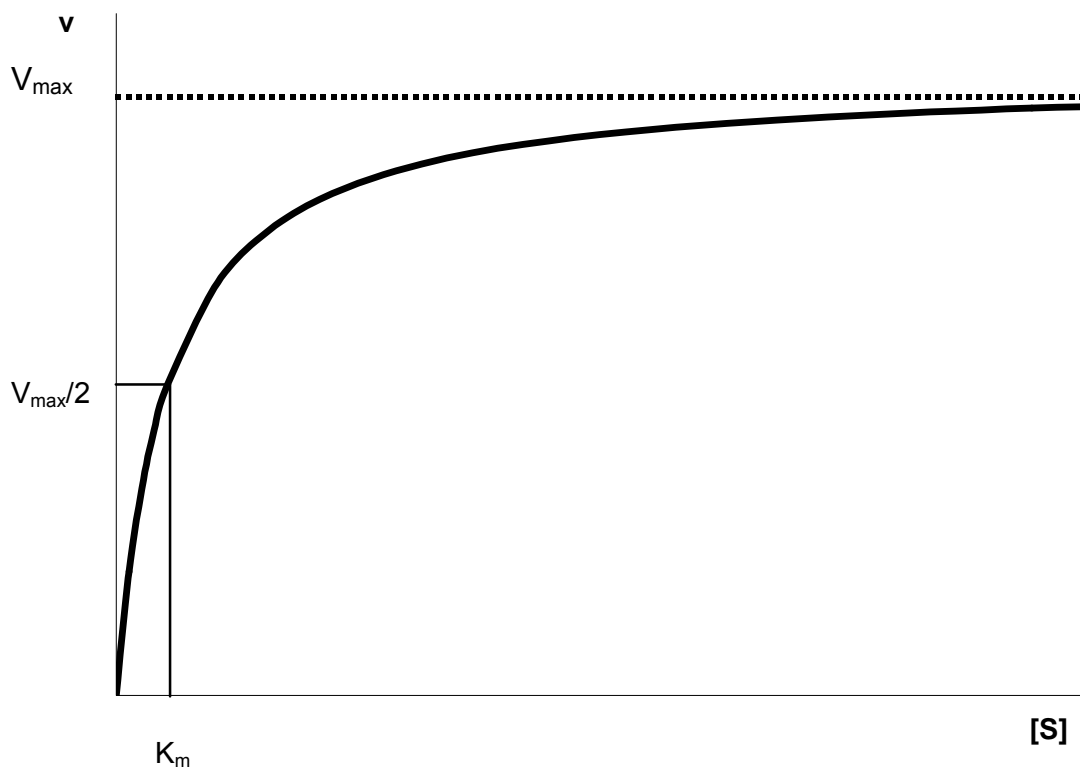


Abb. 2.6 Michaelis-Menten Kurve

Zur Vereinfachung der graphischen Darstellung haben sich zwei Methoden etabliert: die Methoden nach Lineweaver-Burk und nach Hanes.

Durch eine doppelt reziproke Auftragung erreicht man die Darstellung der Werte als Gerade (Abb. 2.7). In dieser Auftragung nach Lineweaver-Burk wird also die reziproke Aktivität gegen die reziproken Substratkonzentrationen aufgetragen. Aus der sich ergebenden Geraden können die Parameter direkt abgelesen werden. Aus dem Schnittpunkt mit der x-Achse ergibt sich hier der negative reziproke  $K_m$ -Wert, während der reziproke  $V_{\max}$ -Wert aus dem Schnittpunkt mit der Y-Achse abzulesen ist. Die Steigung der Geraden berechnet sich als  $K_m/V_{\max}$ .

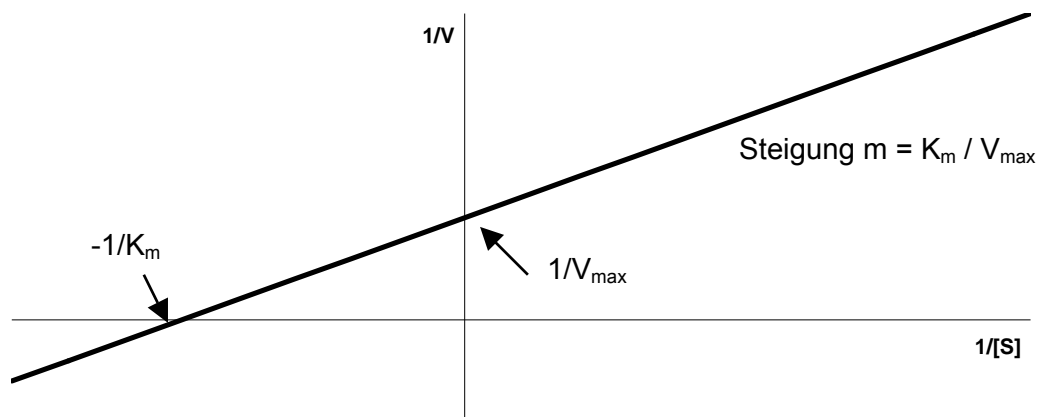


Abb. 2.7: Lineweaver-Burk Diagramm

Bei der Variante nach Hanes wird dagegen der Quotient aus Substratkonzentration und Aktivität gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die sich ergebende Gerade hat die Steigung  $1/V_{\max}$ , der negative  $K_m$ -Wert kann aus dem Schnittpunkt mit der X-Achse abgelesen werden. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse ergibt den Quotienten aus  $K_m$  und  $V_{\max}$  (Abb. 2.8).

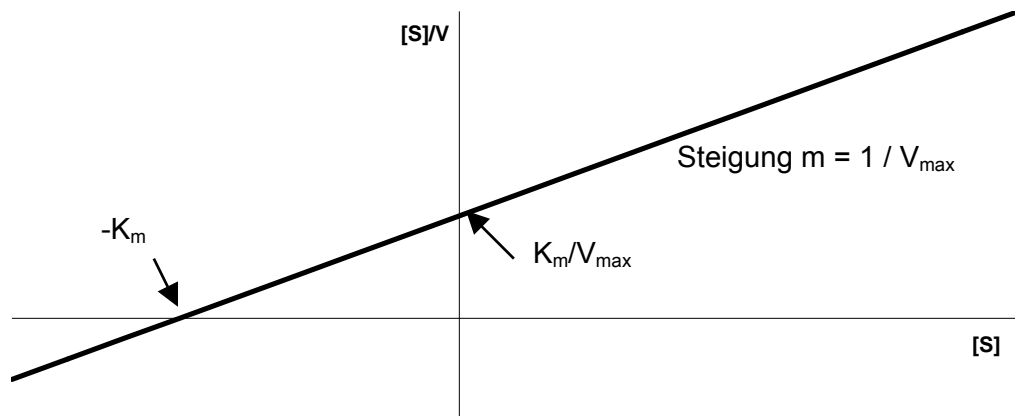


Abb. 2.8: Hanes Diagramm

Durch die doppelt reziproke Auftragung der Daten nach Lineweaver-Burk kann es zu einer ungleichen Gewichtung der Daten kommen. Die Messwerte werden in Richtung der Koordinaten gestaucht, bei der Regression werden dadurch die äußeren Daten, also die kleineren Konzentrationen, proportional stärker gewichtet. Dies kann bei dem Verfahren nach Hanes umgangen werden. Allerdings werden hier die  $V_{\max}$ -Werte direkt aus  $K_m$  berechnet, so dass sich die Fehler bei der Berechnung von  $K_m$  in  $V_{\max}$  fortführen.

Die für die Bestimmung der Michaelis-Menten Kinetik verwendeten Substratkonzentrationen sind in Tabelle 2.19 wiedergegeben. Die Bestimmung der Aktivitäten für diese Lösungen erfolgte nach Kapitel 2.8.1.

	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11
c [μmol/l]	1,34	2,68	5,35	10,71	13,38	16,06	21,41	26,77	40,15	53,54	80,30

Tab 2.19: Konzentrationen der eingesetzten Precursorlösungen zur Bestimmung von  $K_m$  und  $V_{\max}$

### 2.8.5 Bestimmung der Substratspezifität

Zur Bestimmung der Substratspezifität der Alliinase-ähnlichen Aktivität wurde die Aktivität des natürlichen Substrates mit synthetisch hergestellten Cysteinsulfoxiden verglichen. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach Kapitel 2.8.1, dabei wurde das Pyrrolylcysteinsulfoxid gegen die synthetisch hergestellten Cysteinsulfoxide ausgetauscht. Die Konzentrationen der eingesetzten Cysteinsulfoxide sind in Tabelle 2.20 zusammengefasst.

Die relative Aktivität mit Pyrrolylcysteinsulfoxid wurde als 100% angenommen, die Aktivitäten der anderen Cysteinsulfoxide relativ hierzu berechnet.

Substanz	Konzentration $\mu\text{mol/l}$
Pyrrolylcysteinsulfoxid	80,3
Methiin	100,0
Alliin	
Propiin	
Butiin	
Pyridinylcysteinsulfoxid	10,0
Benzoylcysteinsulfoxid	
Furanylcysteinsulfoxid	
Thiazolylcysteinsulfoxid	

Tab. 2.20: eingesetzte Cysteinsulfoxide und ihre Konzentrationen

### 2.8.6 Hemmung der enzymatischen Aktivität

Das untersuchte Alliinase-ähnliche Enzym ist vermutlich ein Pyridoxal-5'-Phosphat abhängiges Enzym wie auch die Alliinase. Um dies zu bestätigen, konnte die Hemmung des Enzyms mit Aminoxyacetat, einem Inhibitor PLP-abhängiger Enzyme, untersucht werden. Hierzu wurde die Enzymlösung mit Aminoxyacetat in Phosphatpuffer (Tabelle 2.7) zu einer Konzentration in der Lösung von 1 mmol/l,

ersetzt. Die Aktivität dieser Enzymlösungen wurde nach Kapitel 2.8.1 im Vergleich zu der unbehandelten Lösung nach 10 Minuten und nach 30 Minuten bestimmt.

### **2.8.7 Bestimmung der Polyphenoloxidase-Aktivität**

Zusätzlich zur Alliinase-ähnlichen Aktivität des Enzyms sollte auch die Polyphenoloxidase-Aktivität charakterisiert werden. Auch hier wurde ein photometrisches Meßsystem mit einem Mikrotiterplattenreader verwendet. Die natürlichen Substrate waren nicht bekannt, daher wurden Brenzcatechin und Dopamin als Modellsubstanzen verwendet. Da das Absorptionsmaximum der oxidierten, braunen Polyphenole bei 385 nm lag, konnte die Umsetzung bei 340 nm und 405 nm beobachtet werden. In die Mikrotiterplatten wurden 90 µl Puffer und 5 µl Probe gegeben. Die Reaktion konnte durch Zugabe von 10 µl der Polyphenollösungen, bzw. 10 µl Puffer für die Blindwerte gestartet werden. Nach 10 Sekunden Schütteln der Platten im Gerät konnten alle 30 Sekunden die Absorptionen bei 340 nm und 405 nm bestimmt werden. Die Enzymaktivität ließ sich auch hier abgeleitet vom Lambert-Beer'schen Gesetz berechnen (Abb. 2.3). Da für die Umsetzung von Brenzcatechin und Dopamin unter diesen Bedingungen keine Extinktionskoeffizienten bekannt waren, mussten diese aus experimentellen Werten berechnet werden. Dazu wurden 10 µl der Lösungen einer bekannten Konzentration (503,1 mmol/l für Brenzcatechin, bzw. 498,8 mmol/l für Dopamin) in 90 µl Phosphatpuffer mit 5 µl der Enzymlösung versetzt und die Absorption am Ende der Reaktion nach ca. 30 Minuten bei 340 nm und 405 nm gemessen. Aus diesen Ergebnissen konnte der molare Extinktionskoeffizient nach der Formel in Abbildung 2.9 berechnet werden.

$\varepsilon = \frac{A}{c}$
mit:
$\varepsilon$ Extinktionskoeffizient
A        Absorption
c:        Konzentration des Substrates in der Küvette

Abb. 2.9: Formel zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten



Zur Bestimmung der Aktivität wurde dieser Wert in die Formel zur Berechnung der Aktivität eingesetzt (Kapitel 2.8.1).

### 2.8.8 Bestimmung der kinetischen Parameter der Polyphenoloxidase-Aktivität

Die Bestimmung des Temperatur-Optimums und des pH-Optimums erfolgte analog Kapitel 2.11.2 und 2.11.3 mit der Methode beschrieben in Kapitel 2.11.7. Die Aktivität wurde bei 18,0; 20,0; 22,5; 25,0; 27,5; 30,0; 32,0; 34,0; 36,0, 38,0 und 40,0°C sowie bei pH 3 bis 11 bestimmt. Es wurden Substratkonzentrationen von 503,1 mmol/l für Brenzcatechin, bzw. 498,8 mmol/l für Dopamin verwendet. Für die Ermittlung des pH-Optimums standen drei Puffersysteme zur Verfügung (Citratpuffer für saure pH-Werte, Phosphatpuffer für neutrale pH-Werte und Boratpuffer für basische pH-Werte, Tabelle 2.8). Auch hier traten große Schwankungen in der Aktivität an den Übergängen der Puffer auf. Daher wurde der gesamte pH-Bereich mit entsprechend eingestellten Phosphatpuffern vermessen (Tabelle 2.7).

Die Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte erfolgte für beide Substrate, Brenzcatechin und Dopamin. Hierzu wurden analog zu Kapitel 2.8.4 die spezifischen Aktivitäten bei verschiedenen Substratkonzentrationen nach Kapitel 2.8.7 bestimmt. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 2.21 wiedergegeben. Die Berechnung von  $K_m$  und  $V_{max}$  erfolgte sowohl nach Lineweaver-Burk als auch nach Hanes (Kapitel 2.8.4).

	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9
<b>c Brenzcatechin [mmol]</b>	20	40	50	75	100	200	250	300	400
<b>c Dopamin [mmol]</b>	20	30	50	75	100	200	250	300	400

	c10	c11	c12	c13	c14	c15	c16	c17	/
<b>c Brenzcatechin [mmol]</b>	500	750	1000	1500	2000	2500	3000	/	/
<b>c Dopamin [mmol]</b>	500	1000	1500	2000	2500	3000	4000	5000	/

Tab. 2.21: Für die Ermittlung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte eingesetzte Polyphenolkonzentrationen

### **2.8.9 Substratspezifität der Polyphenoloxidase-Aktivität**

Für die Bestimmung der Substratspezifität wurde die spezifische Umsetzung verschiedener Polyphenole nach der Methode in Kapitel 2.8.7 bestimmt. Als Substrate standen hierzu Resorcin, Hydrochinon, Gallussäure und Kaffeesäure neben Brenzcatechin und Dopamin zur Verfügung. Die Konzentration der eingesetzten Lösungen betrug 0,5 mol/l. Die spezifische Aktivität für Dopamin wurde als 100% angenommen, die relativen Aktivitäten der anderen Substanzen entsprechend berechnet.

### **2.8.10 Hemmung der Polyphenoloxidase-Aktivität und Effekte von Metallionen**

Polyphenoloxidase sind normalerweise Metalloproteine mit Metallionen in der aktiven Bindetasche. Diese sind essentiell für die katalytische Aktivität. Das Entfernen dieser Ionen führt zu einem Verlust der Aktivität.

Um die Auswirkung der Abtrennung von Metallionen auf die enzymatische Aktivität zu testen, wurde das Enzym mit einer EDTA-Lösung (1 M) versetzt. Nach einer Stunde konnte das EDTA durch einen Wechsel des Puffers auf Phosphatpuffer entfernt werden (Amicon Filtertubes, Millipore, 30 kDa Ausschlussvolumen, Volumen 15 ml, 2000 rpm). Die Bestimmung der Aktivität der resultierenden Lösung erfolgte nach Kapitel 2.8.7.

Der EDTA-inaktivierte Extrakt wurde mit verschiedenen Metallionenlösungen versetzt, um deren Auswirkungen auf die Aktivität zu untersuchen. Die Metallionen (10 µl, 0,1 mol/l) wurden zu den Enzymlösungen gegeben und ca. 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss konnten die Aktivitäten der Lösungen nach Kapitel 2.8.7 bestimmt werden. Als Blindwerte dienten die mit Metallionenlösung versetzten Puffer ohne Enzym. Die Aktivitäten nach der Zugabe von Zinkionen wurde als 100% angenommen und die relativen Aktivitäten der anderen Metallionenlösungen entsprechend berechnet.

### **2.8.11 Bestimmung der Aktivität der Farbstoffbildung**

Die Bildung des Farbstoffes ist eine mehrstufige Reaktion. Dennoch kann die Aktivität dieser Gesamtreaktion bestimmt werden. Hierzu wurde die Bildung des Farbstoffes photometrisch im Mikrotiterplattenreader bestimmt. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt bei 515 nm, die Bildung des Farbstoffes konnte also bei 492 nm und 540 nm bestimmt werden.

Hierzu wurden 90  $\mu$ l Phosphatpuffer vorgelegt und 5  $\mu$ l Enzymlösung hinzugegeben. Die Reaktion konnte durch Zugabe von 10  $\mu$ l der Precursurlösung (33,2  $\mu$ M) gestartet werden. Nach Schütteln im Gerät (10 Sekunden) wurde die Absorption alle 60 Sekunden bestimmt.

Zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten wurden Precursurlösungen einer bekannten Konzentration (33,2  $\mu$ M) mit der Enzymlösung versetzt und die Absorptionen nach Beendigung der Reaktion (ca. 30 Minuten) vermessen. Der molare Extinktionskoeffizient kann nach der Formel in Abbildung 2.9 berechnet werden.

### **2.8.12 Bestimmung der kinetischen Parameter der Aktivität der Farbstoffbildung**

Die Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums erfolgte nach Kapitel 2.8.2 und 2.8.3 mit der Methode zur Aktivitätsbestimmung in Kapitel 2.8.11. Die Bestimmung erfolgte bei 18,0; 20,0; 22,5; 25,0; 27,5; 30,0; 32,0; 34,0; 36,0, 38,0 und 40,0°C sowie bei pH 3 bis 11. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden erneut alle drei Puffersysteme eingesetzt (Citratpuffer für saure pH-Werte, Phosphatpuffer für neutrale pH-Werte und Boratpuffer für basische pH-Werte, Tabelle 2.8). Da auch hier große Aktivitätssprünge an den Pufferübergängen auftraten, musste die Messung mit einem Phosphatpuffer über den gesamten pH-Bereich wiederholt werden.

Die Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte erfolgte nach Kapitel 2.8.4 mit der Methode zur Bestimmung der Aktivität nach Kapitel 2.8.11. Hierzu wurden unterschiedliche Substratkonzentrationen verwendet (Tabelle 2.22). Die Berechnung von  $K_m$  und  $V_{max}$  erfolgte nach Lineweaver-Burk und nach Hanes (Kapitel 2.8.4).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
c [ $\mu$ M]	130,98	104,78	78,59	65,49	52,39	26,20	13,10	10,48	7,86

	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	/
c [ $\mu$ M]	6,55	5,24	2,62	1,31	0,98	0,65	0,49	0,33	/

Tab. 2.22: Substratkonzentrationen zur Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte

## 2.9 Farbstoff

Der Farbstoff konnte für *A. giganteum* von Jedelská [2007] als Dithiodipyrrol bestimmt werden. Im folgenden sollte untersucht werden, ob derselbe Farbstoff auch in den anderen Arten des Subgenus *Melanocrommyum* enthalten ist.

### 2.9.1 Herstellung der Farbstoffextrakte

Die Herstellung der Extrakte zur Isolierung des Farbstoffes erfolgte nach Jedelská [2007]. Hierzu wurden die Zwiebeln (5 bis 10 g, *A. macleanii* und *A. rosenorum*) gesäubert, kleingeschnitten und in einem Mixer (Braun KSM1) zu einer homogenen Masse zerkleinert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden ca. 50 ml Wasser hinzugegeben und das Gemisch für ca. 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die rot-verfärbte Masse wurde zentrifugiert (1 Stunde, 4000 rpm) und der Überstand entfernt. Im Anschluss erfolgte die Extraktion jeweils zwei mal mit je 200 ml Dichlormethan und 200 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Extrakte wurden eingeeengt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zusätzlich erfolgte die Herstellung weiterer Extrakte. Dazu wurden die Zwiebeln zunächst genauso behandelt wie oben beschrieben, ca. 16 Stunden inkubiert und zentrifugiert. Die Extraktion der Zwiebelmasse erfolgte dann hintereinander je zweimal mit jeweils 200 ml Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol und Wasser. Die organischen Phasen des gleichen Lösungsmittels wurden vereinigt und eingeeengt, die vereinigten wässrigen Phasen wurden lyophilisiert. Die Extrakte konnten bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Zusätzlich wurden weitere Extrakte (Methanol, Methanol-wässrig und Ethylacetat) von verschiedenen Proben der Arten *A. macleanii*, *A. rosenorum*, *A. jesdianum* und *A. giganteum* angefertigt. Die Extrakte wurden eingeeengt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Ein Teil der Extrakte sollte für ca. 14 Monate gelagert werden, um die Inhaltsstoffe in älteren, gelagerten Extrakten zu untersuchen.

### 2.9.2 Aufreinigung der Farbstoffextrakte

Die weitere Aufreinigung der Farbstoffextrakte erfolgte mittels Flash Chromatographie an einer Kieselgelsäule. Es wurden sowohl die vereinigten Dichlormethan/Ethylacetat Extrakte als auch die Dichlormethan-, Ethylacetat- und Methanolextrakte verwendet. Hierzu wurde Kieselgel 60 in Petrolether suspendiert. Nach der Aufgabe der Proben erfolgte die Elution mit einem schrittweisen Gradienten von Petrolether / Ethylacetat / Methanol / Wasser [nach Jedelská 2007]. Die Fraktionen wurden einzeln aufgefangen, eingeeengt und bis zur genaueren Untersuchung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.9.3 MS/MS Messungen der Farbstoffextrakte

Die Farbstoffextrakte sollten mittels MS/MS Messungen genauer untersucht werden. Die in Methanol gelösten Proben wurden über eine Spritzenpumpe mit einer Fließgeschwindigkeit von  $10\text{ }\mu\text{l/min}$  direkt injiziert. Die allgemeinen Einstellungen können Tabelle 2.10. entnommen werden. Die substanzabhängigen Parameter sind in Tabelle 2.23 zusammengefasst.

m/z	Collision Activated Dissociation Gas (CAD)	Cell exit potential (CXP)	Cell entrance potential (CEP)	Collision energy (CE)
193	2	-3	-13,59	-20
225	3	-3	-12,69	-27
227	2	-3	-12,69	-23
256	5	-3	-16,15	-27
257	2	-3	-16,15	-20
289	2	-3	-16,65	-20
386	2	-3	-30,05	-20

Tab. 2.23: Einstellungen der MS/MS Messungen für die einzelnen Substanzen

#### 2.9.4 HPLC-MS Messungen der Farbstoffextrakte

Außerdem wurden die Farbstoffextrakte mittels HPLC-MS untersucht. Die Fließmittelbedingungen sind in Tabelle 2.24 wiedergegeben. Die Injektionsmenge betrug 10 oder 20 µl, die UV-Detektion erfolgte bei 245 nm und 515 nm. Es wurden Messungen sowohl mit positiver als auch mit negativer Ionisierung durchgeführt.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	H <sub>2</sub> O [%]	MeOH [%]
0	0,15	95	5
25	0,15	5	95
50	0,15	5	95

Tab. 2.24 Fließmittelbedingungen der HPLC Messung zur Messung der Farbstoffextrakte

Die Einstellungen der MS-Messungen können Tabelle 2.10 entnommen werden.

### 2.10 Inhaltstoffe von *A. stipitatum*

*A. stipitatum* gehört zu den Arten des Subgenus *Melanocrommyum*, die bei einer Verletzung des Zellgewebes keinen roten Farbstoff ausbilden. Daher sollten Extrakte dieser Art untersucht und die Inhaltsstoffe mit anderen untersuchten Arten verglichen werden.

#### 2.10.1 Extrakte von *A. stipitatum*

Die Extrakte von *A. stipitatum* konnten analog zu den Extrakten zur Isolierung der Precursorsubstanz angefertigt werden (Kapitel 2.4.1). Auch hier wurden die Zwiebeln unter flüssigem Stickstoff homogenisiert, zunächst mit Methanol und im Anschluss mit Wasser extrahiert. Die methanolische Fraktion wurde vorsichtig bei möglichst geringen Temperaturen eingeeengt. Weitere Untersuchungen der methanolischen Extrakte fanden mit den in Kapitel 2.4.2 beschriebenen analytischen und präparativen HPLC Methoden statt.

### 2.10.2 MS/MS und HPLC-MS Messungen der Extrakte von *A. stipitatum*

Die genauere Untersuchung des methanolischen Extraktes erfolgte mittels MS/MS-Messungen. Hierzu wurde die in Methanol gelöste Probe direkt über eine Spritzenpumpe injiziert (10 µl/min). Die Parameter für die Bestimmungen können Tabelle 2.10 entnommen werden. Die substanzspezifischen Einstellungen sind in Tabelle 2.25 zusammengefasst.

m/z	Collision Activated Dissociation Gas (CAD)	Cell exit potential (CXP)	Cell entrance potential (CEP)	Collision energy (CE)
215	2	3	24,54	20
152	2	3	23,09	20

Tab. 2.25: Einstellungen der MS/MS Messungen für einzelne Substanzen

Des weiteren wurden die Proben mittels HPLC-MS untersucht. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,2 ml/min. Es wurden 20 µl der Proben injiziert. Die UV-Detektion erfolgte bei 220 nm und 245 nm. Die HPLC Methode wurde in Tabelle 2.26 zusammengefasst.

Die Parameter der MS Messungen sind in Tabelle 2.10 wiedergegeben.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	H <sub>2</sub> O [%]	MeOH [%]
0	0,20	100	0
10	0,20	100	0
50	0,20	5	95
70	0,20	5	95
75	0,20	100	0

Tab. 2.26: Fließmittelbedingungen der HPLC-Messung zur Untersuchung der Extrakte aus *A. stipitatum*

## 2.11 Extrakte von *Allium* Arten zur Steroidbestimmung

Zur Bestimmung der Steroidsaponine in *Allium*-Arten wurden die Zwiebeln 30 Minuten unter Rückfluss mit Methanol extrahiert. Die weitere Aufreinigung der eingeeengten Extrakte erfolgte über C18 SPE-Kartuschen. Die in Wasser rückgelösten Proben wurden auf die mit Methanol und Wasser konditionierten Kartuschen gegeben. Nach dem Spülen mit einem Wasser/Aceton Gemisch (8:2) erfolgte die Elution der Steroide mit Methanol. Die eingesetzten Zwiebelarten sind in Tabelle 2.27 aufgeführt.

Art	Tax oder Acc-Nummer	Art	Tax oder Acc-Nummer
<i>A. macleanii</i>	6240	<i>A. jesdianum</i>	1180
<i>A. macleanii</i>	6190	<i>A. rosenorum</i>	6153
<i>A. macleanii</i>	Usbekistan	<i>A. elburzense</i>	1208
<i>A. jesdianum</i>	1178	<i>A. stipitatum</i>	1076

Tab. 2.27: Eingesetzte *Allium*-Arten

### 2.11.1 HPLC-MS Messungen zur Steroidbestimmung

Die aufgereinigten Extrakte wurden mit HPLC-MS-Messungen weiter untersucht. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl, die UV-Detektion erfolgte bei 225 nm. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min wurden die Fließmittelbedingungen in Tabelle 2.28 angewandt.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	H <sub>2</sub> O [%]	MeOH [%]
0	0,20	95	5
30	0,20	5	95
35	0,20	5	95

Tab. 2.28: Fließmittelbedingungen der HPLC Messung der Steroidbestimmung

Die Einstellungen der MS Messungen können aus Tabelle 2.10 entnommen werden.



## 2.12 Extrakte von *Hoodia* und verwandten Arten zur Steroidbestimmung

Es wurden die Steroidglykoside in den unter Tabelle 2.29 aufgeführten Arten untersucht.

Gattung	Art
<i>Hoodia</i>	<i>Hoodia gordonii</i> 1
	<i>Hoodia gordonii</i> 2
	<i>Hoodia gordonii</i> 3
	<i>Hoodia flavum</i>
	<i>Hoodia juttae</i>
	<i>Hoodia ruschii</i>
	<i>Hoodia bradei</i>
	<i>Hoodia pilifera</i>
	<i>Hoodia currorii</i>
<i>Stapelia</i>	<i>Stapelia leendertziae</i>
	<i>Stapelia gigantea</i>
	<i>Stapelia grandiflora</i>
<i>Orbea</i>	<i>Orbea decaisneana</i>
<i>Tromotriche</i>	<i>Tromotriche revoluta</i>
<i>Quaqua</i>	<i>Quaqua mammilaris</i>
	Kapsel

Tab. 2.29: Zusammenfassung der Arten die auf Steroidglykoside untersucht wurden

Zur Untersuchung der Steroidglykoside wurde eine Methode analog zur Aufreinigung der Steroide in *Allium*-Arten verwendet. Zunächst erfolgte die Extraktion der lyophilisierten Pflanzenteile unter Rückfluss für 30 Minuten mit Methanol. Die am Rotationsverdampfer eingeeengten Extrakte wurden über C18 SPE-Kartuschen aufgereinigt. Hierzu konnten die Kartuschen zunächst mit Methanol und Wasser konditioniert und die in Wasser gelöste Probe aufgegeben werden. Nach dem Waschen mit einem Wasser/Aceton Gemisch (8:2) wurde mit Methanol eluiert.

### 2.12.1 MS/MS und HPLC-MS Messungen der Extrakte

Die MS/MS Messungen wurden in der Ionenfalle des Massenspektrometers durchgeführt (enhanced product ion Modus). Die substanzspezifischen Einstellungen können aus Tabelle 2.30 entnommen werden.

m/z	Collision Activated Dissociation Gas (CAD)	Collision Cell Entrance Potential (CEP)	Collar 2 Barrier (C2B)	Collision Energy Spread (CES)	Declustering Potential (DP)
1040	high	30,24	-380	0	5
1024	high	29,99	-380	0	5

Tab. 2.30: Einstellungen der MS/MS-Messungen für einzelne Substanzen

Die HPLC-MS Messungen wurden analog der Methode zur Bestimmung der Steroide in *Allium*-Arten durchgeführt (Kapitel 2.11).



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Farbstoff Precursor

Einige Arten des Subgenus *Melanocrommyum* sind in ihren Heimatländern dafür bekannt, bei Verwundung der Zellstruktur einen roten Farbstoff zu entwickeln.

Die Struktur des von der Pflanze gebildeten Stoffes konnte bereits für *A. giganteum* aufgeklärt werden [Jedelská 2007]. Es handelt sich um ein Dithiodipyrrol (Abb. 1.9). Dieses wird von allen oberirdischen und unterirdischen Pflanzenteilen wie Blättern und Zwiebeln gebildet. Zum besseren Verständnis der biochemischen Prozesse in der Pflanze mussten auch die Vorläufer des Farbstoffes in der Pflanze isoliert werden.

##### 3.1.1 Isolierung des Farbstoff Precursors

Zur Aufreinigung des Precursors wurde zunächst ein Rohextrakt nach Kapitel 2.5.1 hergestellt. Hierfür wurden die geschälten und gereinigten Zwiebeln sofort in flüssigen Stickstoff gegeben und homogenisiert. Durch die niedrigen Temperaturen des flüssigen

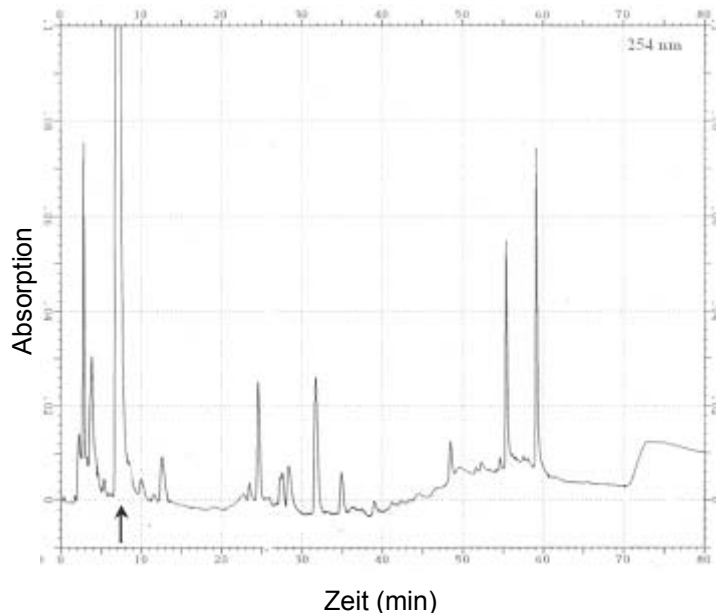


Abb. 3.1: Chromatogramm der analytischen HPLC (UV-Detektion 254 nm). Der Pfeil zeigt den Hauptpeak bei 7 min.

Stickstoffes wurden die Enzyme reversibel inaktiviert. Somit war also eine Homogenisierung des Materials möglich, ohne eine Umsetzung des Precursors zu dem Farbstoff zu bewirken. Das homogenisierte Pulver wurde mit Methanol versetzt und bei 4°C inkubiert. Hierdurch erfolgte eine teilweise Denaturierung und Inaktivierung der Enzyme. Eine vollständige

Inaktivierung war auf diese Art nicht möglich. Hierzu wäre ein Erhitzen des Materials notwendig. Aufgrund einer möglichen Instabilität der Inhaltsstoffe sowie der

beobachteten Verfärbung der Extrakte bei höheren Temperaturen wurde hiervon abgesehen und die gesamte Aufarbeitung bei 4°C durchgeführt.

Die eigentliche Extraktion fand im Anschluss mit Wasser bei 4°C statt. Das Lyophilisat dieses Extraktes war farblos und bei –20°C über mehrere Monate stabil. Die Lagerung des Extraktes über einige Stunden bei Raumtemperatur führte zu einer Renaturierung der Enzyme und damit zu einer roten Verfärbung des Substrates.

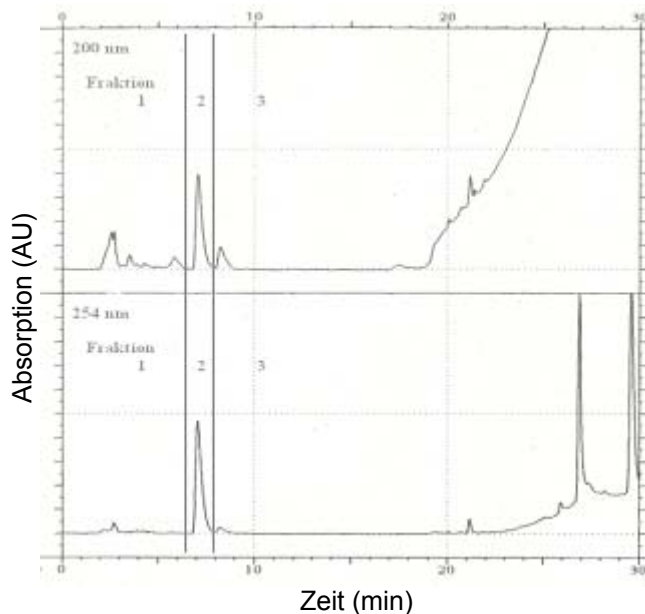


Abb. 3.2: Chromatogramm der präparativen HPLC (UV-Detektion 200 und 254 nm)

Hauptpeak bei 7 Minuten. Mit dieser HPLC-Methode konnte auch der Farbstoff photometrisch bei 515 nm nachgewiesen werden (Retentionszeit 46 Minuten; Chromatogramm hier nicht dargestellt).

Zur präparativen Aufreinigung der aktiven Fraktion wurde die Methode auf eine präparative HPLC übertragen (Kapitel 2.5.2). Das Chromatogramm der präparativen HPLC ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die entsprechende Fraktion (Fraktion 2 mit einer Retentionszeit von 7 Minuten) war bei sofortigem, vorsichtigen Einrotieren bei –20°C mehrere Wochen stabil. Die gesamte Ausbeute betrug 57 mg, dies entspricht 0,013% bezogen auf das Frischgewicht. Das UV-Maximum der isolierten Substanz lag bei 220 nm und 250 nm.

Zur weiteren Aufreinigung wurde zunächst die Trennung mittels analytischer HPLC optimiert. Die besten Ergebnisse erzielten die Bedingungen unter Kapitel 2.5.2. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 254 nm, die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und konzentriert. Das Chromatogramm der analytischen HPLC ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Bei Zugabe von Enzymrohextrakten zeigte nur eine Fraktion eine rote Verfärbung, nämlich der

### 3.1.2 Strukturaufklärung des Precursors

Die MS-Daten (eine Beschreibung der Methode befindet sich in Kapitel 2.5.3) der isolierten Komponente deuteten auf eine Substanz mit zwei Stickstoffatomen und einer molekularen Masse von 202 g/mol ( $m/z$  203, positive Ionisierung) hin. Die Ergebnisse der HR-MS Messungen ließen auf ein Molekül mit der Summenformel  $C_7H_{10}N_2O_3S$  schließen (Kapitel 2.4). Die ermittelte Masse von  $(M+H)^+$  203,044761 korrelierte gut mit dem berechneten Wert von  $(M+H)^+$  203,0490. Des weiteren konnte das Natriumaddukt des in der Ionenquelle gebildeten Dimers bestimmt werden. Auch hier stimmte der experimentell bestimmte Wert ( $(M+Na)^+$  427,074966) gut mit dem berechneten Wert überein ( $(M+Na)^+$  427,072198, Summenformel:  $C_{14}H_{20}N_4O_6S_2Na$ ).

Zur weiteren Aufklärung der Struktur der Substanz wurden MS/MS Experimente durchgeführt. Die Fragmentierung erfolgte unter den in Kapitel 2.5.3 aufgeführten Bedingungen. Das Fragmentierungsspektrum ist in Abbildung 3.3 a und b wiedergegeben.

Ein Vergleich des Fragmentierungsmusters der isolierten Substanz mit dem Fragmentierungsmuster des Alliins (Abb. 3.3 a und b) zeigte einige Übereinstimmungen. Beide Substanzen zerfielen in die Fragmente  $m/z$  74,  $m/z$  88 und  $m/z$  136. Diese waren einem Cysteinsulfoxidrest zuzuordnen. Aus den HR-MS-Daten und dem Fragmentierungsmuster ergab sich die in Abbildung 3.4 dargestellte Struktur. Typisch für den Pyrrolrest war das Fragment  $m/z$  68, das dem abgespaltenen Pyrrolring entspricht.

## Ergebnisse

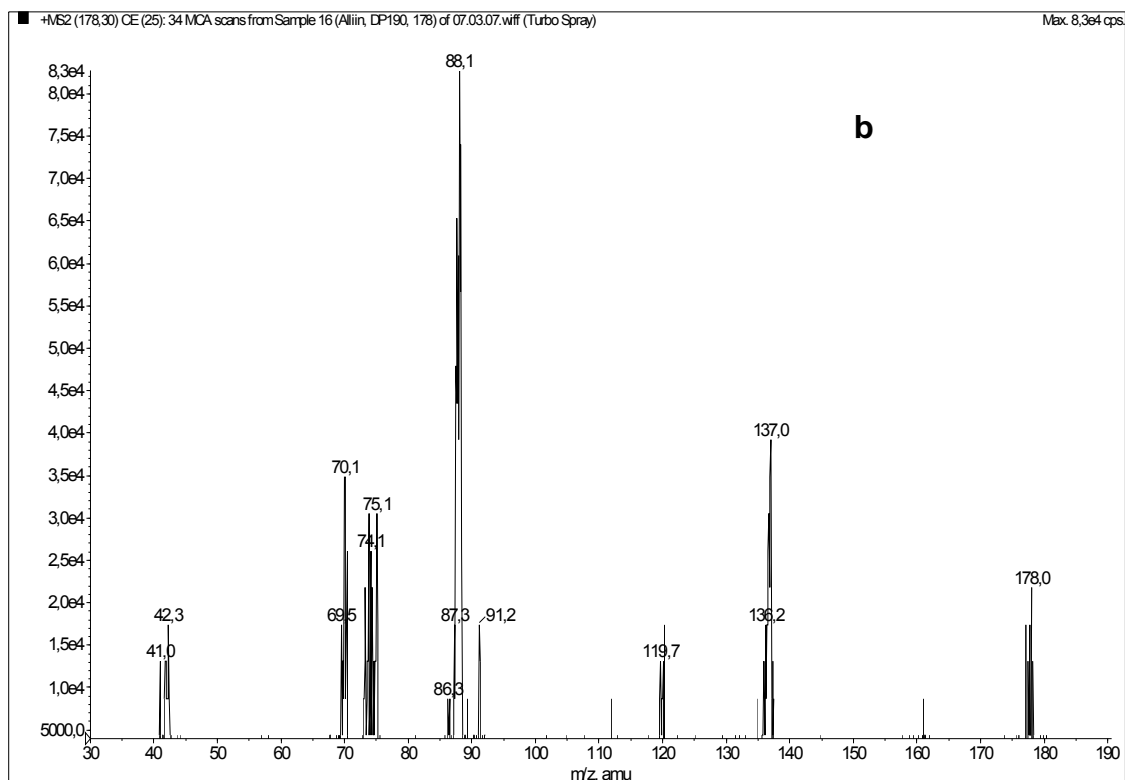
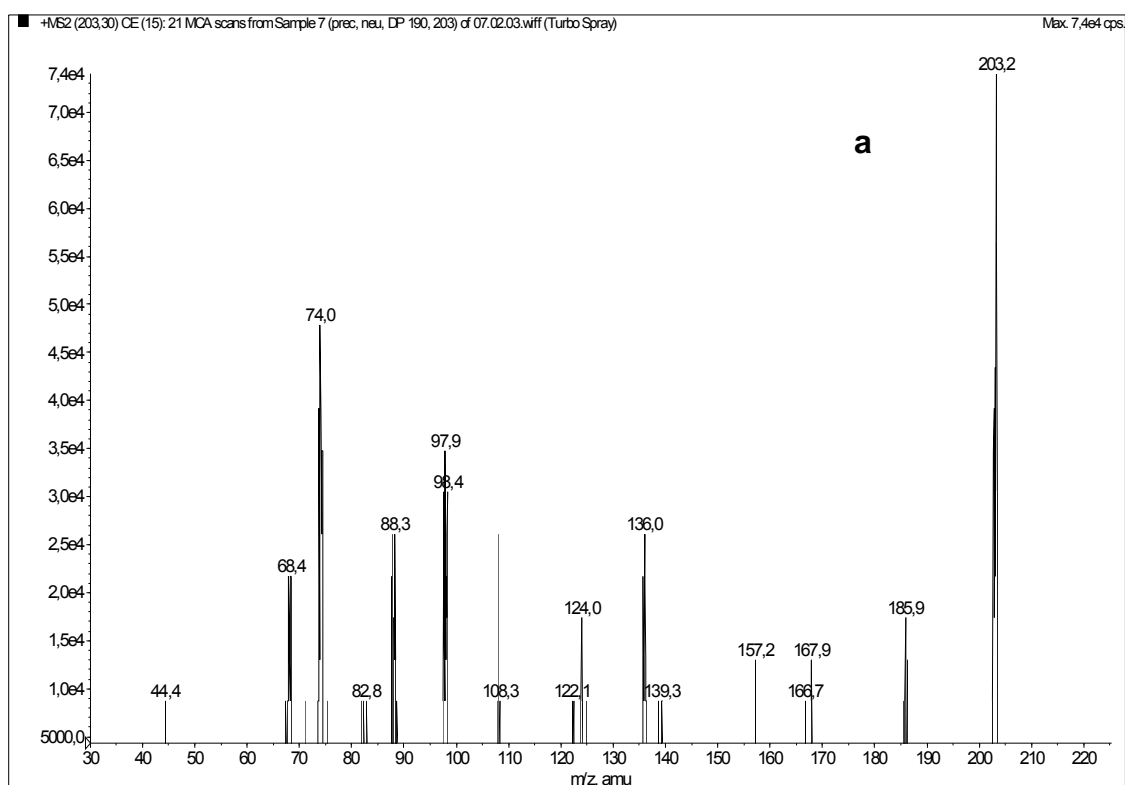


Abb. 3.3: Fragmentierungsmuster der isolierten Substanz (a) und von Alliin (b)

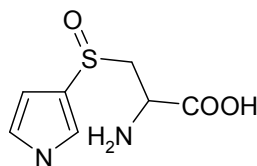


Abb. 3.4: Struktur des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxids

Die Strukturvorschläge für die Fragmente, die sich aus den oben genannten Überlegungen ergaben, sind in Abbildung 3.5 aufgeführt. Die Fragmente  $m/z$  74,  $m/z$  88 und  $m/z$  136 stammten hierbei aus dem Aminosäurerest,  $m/z$  68 entsprach dem Pyrrolylrest und  $m/z$  186 der Abspaltung der Aminogruppe.

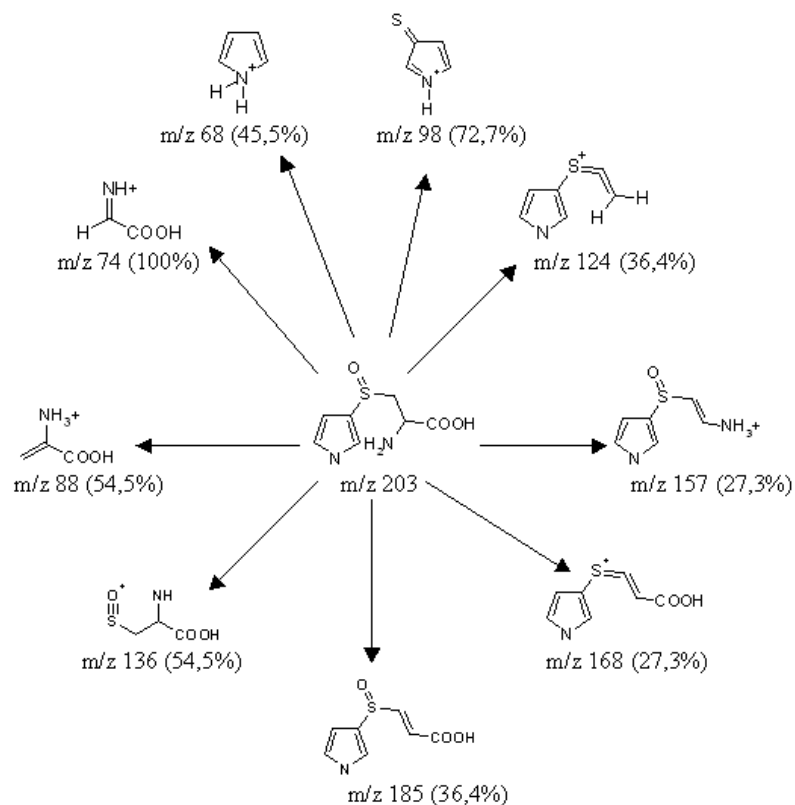


Abb. 3.5: Strukturvorschläge zur Fragmentierung von  $m/z$  203

Zur genaueren Aufklärung der Struktur wurden die Daten der NMR-Messungen herangezogen. Korrelationsexperimente wie HSQC, HMBC und COSY trugen hierzu bei (Kapitel 2.4). Die HMBC Korrelationen sind in Abbildung 3.6 wiedergegeben.



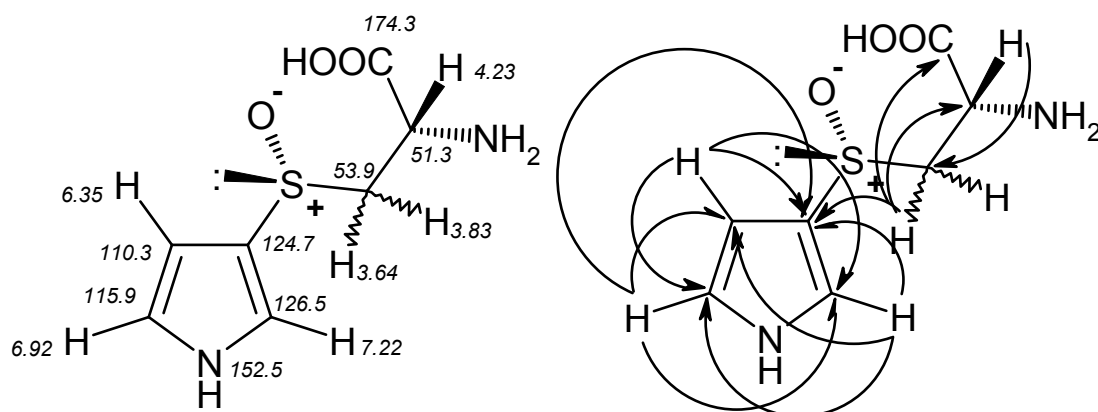


Abb. 3.6: Formel und Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  HMBC Korrelationen der Precursor Substanz

Besonders interessant war die Korrelation zwischen dem Methylen-Proton (3,64 ppm) und dem quartären Kohlenstoff-Atom des Pyrrolrings (C3', 124,7 ppm). Hierdurch ergab sich die Verbindung zwischen den beiden Teilen des Moleküls. Der Pyrrolring war charakterisiert durch die Protonensignale bei 7,22 ppm (H2'), 6,35 ppm (H4') und 6,92 ppm (H5'). Die zugehörigen Kohlenstoffatome wurden nachgewiesen bei 126,5 ppm (C2'), 110,3 ppm (C4') und 115,9 ppm (C5').

	L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid		L-(+)-Alliin	
	Protonensignal	Kohlenstoffsignal	Protonensignal	Kohlenstoffsignal
H1, bzw. C1	/	174,3 ppm	/	174,0 ppm
H2, bzw. C2	4,21 ppm	51,3 ppm	4,18 ppm	53,7 ppm
H3, bzw. C3	3,64 ppm	53,9 ppm	3,21 ppm	57,9 ppm
	3,83 ppm		3,45 ppm	

Tab. 3.1: Vergleich der NMR-Daten von L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid und L-(+)-Alliin

Besonders charakteristisch für das isolierte Molekül war der Cysteinrest. Die zugehörigen NMR-Signale zeigten starke Übereinstimmungen mit den NMR-Daten anderer synthetisch hergestellter Cysteinsulfoxide wie Alliin [Keusgen 1998]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die NMR-Spektren von L-(+)-Alliin zeigten

Wellenzahl (cm <sup>-1</sup> )	Intensität	Funktionelle Gruppe
3200	S	$\nu$ NH (Pyrrol)
3100	M	$\nu$ C=C-H (Aryl) $\nu$ NH <sub>3</sub>
2990	M	$\nu$ CH <sub>2</sub>
2700	M	$\nu$ NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> (Pyrrol)
2400	M	$\nu$ NH <sub>2</sub> -CH-COOH
2150	M	$\nu$ NH <sub>2</sub> -CH-COOH
1620	S	$\nu$ COO <sup>-</sup> $\nu$ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
1550	M	$\delta$ NH
1410	S	$\delta$ C-C (Alkyl)
1380	S	$\delta$ C-C (Alkyl)
1000	S	$\delta$ S=O
750	S	$\delta$ C-H (Aryl)

Tab. 3.2 charakteristische Banden des FT-IR-Spektrums

Protonensignale bei 4,18 ppm (H2), 3,21 ppm (H3) und 3,45 ppm (H3) sowie Kohlenstoffsignale bei 174,0 ppm (C1), 53,7 ppm (C2) und 57,9 ppm (C3). Die isolierte Substanz zeigte die zugehörigen chemischen Verschiebungen bei 4,21 ppm (H2), 3,64 ppm (H3), 3,83 ppm (H3), 174,3 ppm (C1), 51,3 ppm (C2) und 53,9 ppm (C3). Daraus konnte geschlossen werden, dass sich die Substanz von L-Cystein ableitet.

Aus den Protonenspektren konnten weitere Strukturinformationen gewonnen werden. Ein Vergleich des Spektrums mit den Daten der <sup>1</sup>H-NMR Spektren von synthetischen (+)- und (-)-Cysteinsulfoxiden zeigte, dass es sich vermutlich um ein (+)-Isomer handelt. Dies konnte aus der Verschiebung der H3-Protonen ermittelt werden. Die Differenz der Verschiebung zwischen diesen beiden Protonen betrug für die (+)-

Isomere 0,2 ppm, während die Signale für die (-)-Isomere zusammenfallen [Keusgen 1998]. Die Verschiebung der beiden Protonen betrug für die isolierte Substanz 0,2 ppm, woraus auf ein (+)-Isomer geschlossen werden konnte.

Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse der optischen Rotation bestätigt. Diese wurde bei 589 nm bei 20°C bestimmt. Die eingesetzte Lösung hatte eine Konzentration

von 1,1 mg/ml, das entspricht 5,45 mM. Der mittlere Drehwert betrug unter diesen Bedingungen 0,0587. Daraus errechnete sich die optische Rotation nach Kapitel 2.5.4 auf  $[\alpha_D^{21}] +53.3 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$  (589 nm, in Wasser). Der Literaturwert der optischen Rotation von L-(+)-Alliin wurde mit  $[\alpha_D^{21}] +62.8^\circ \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$  [Stoll und Seebeck 1948] angegeben. Die Abweichung der beiden Werte voneinander betrug 15,1%, was durch das höhere Molekulargewicht der isolierten Substanz bedingt sein könnte (L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid 202 g/mol; L-(+)-S-2-(Propenyl)Cysteinsulfoxid (L-(+)-Alliin) 177 g/mol). Auch der Pyrrolring der Vorläufersubstanz anstelle der Allylgruppe des Alliins konnte einen Einfluss auf die optische Rotation ausüben.

Die erhaltenen Ergebnisse der Strukturaufklärung wurden unterstützt durch das FT-IR Spektrum. Bei  $3200 \text{ cm}^{-1}$  war deutlich die Bande der Valenzschwingung der NH-Bindung des Pyrrols zu erkennen, die der Säure- und der Amingruppe waren bei  $1620 \text{ cm}^{-1}$  vorhanden. Bei  $1000 \text{ cm}^{-1}$  befand sich die für Sulfoxide typische S=O Deformationsschwingung. Weitere, Strukturelementen zugeordnete Banden, sind in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

### **3.2 Proteinuntersuchungen**

Neben der Isolierung der natürlichen Vorläufersubstanz des Farbstoffes war auch die nähere Charakterisierung des an der Reaktion beteiligten Enzyms von Bedeutung. Bisher ist wenig über dieses Protein bekannt. Die Umsetzung eines Vorläuferextraktes zu einem roten Farbstoff war auch mit teilweise aufgereinigter Alliinase aus *A. sativum* möglich. Daher könnte das gesuchte Enzym eine Alliinase-ähnliche Aktivität aufweisen. Diese Annahme wurde durch die Aufklärung der Struktur des Precursors unterstützt. Es handelte sich um ein Cysteinsulfoxid; demzufolge lag eine Umsetzung mit einem Alliinase-ähnlichen Enzym nahe. Eine Isolierung und Charakterisierung des beteiligten Enzyms könnte wichtige Erkenntnisse über den Biogeneseweg des roten Farbstoffes liefern.

#### **3.2.1 Ergebnisse der Proteinextraktion**

Zunächst wurden hierzu Proteinrohextrakte verschiedener Arten des Subgenus *Melanocrommyum* gewonnen und diese miteinander verglichen. Die hierzu vorwiegend verwendeten Arten *A. macleanii*, *A. giganteum* oder *A. rosenorum* bilden den roten Farbstoff. Als Vergleich dienten Arten wie *A. stipitatum* oder *A. aflatunense*, die keinen roten Farbstoff produzieren. Zusätzlich wurden Extrakte von Küchenzwiebel (*A. cepa*) und Knoblauch (*A. sativum*) als Vergleich aus anderen Untergattungen herangezogen.

Die Herstellung der Proteinrohextrakte erfolgte nach Kapitel 2.6.1. Sie waren die Ausgangssubstanzen für verschiedene Untersuchungen. Zum einen sollten mit Hilfe dieser Rohextrakte die Proteinmuster der einzelnen Arten verglichen werden. Zum anderen dienten sie der Aufreinigung des gesuchten Enzyms, das an der Bildung des Farbstoffes beteiligt ist.

##### **3.2.1.1 Bestimmung des Proteingehaltes**

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte photometrisch nach Lowry und Bradford (Kapitel 2.6.3). Die Proteingehalte der Extrakte lagen zwischen 1 und 10 mg/ml. Ein Vergleich der Proteinausbeuten aus der Rohsubstanz einiger Spezies ist exemplarisch in Abbildung 3.7 wiedergegeben. Zu beachten ist hierbei, dass zur Extraktion frische, nicht getrocknete Proben verwendet wurden. Abhängig vom Lagerungszeitraum und der Herkunft der Zwiebeln schwankte der Wassergehalt in den

Proben stark. Damit waren auch die großen Schwankungen in der Proteinausbeute zu erklären.

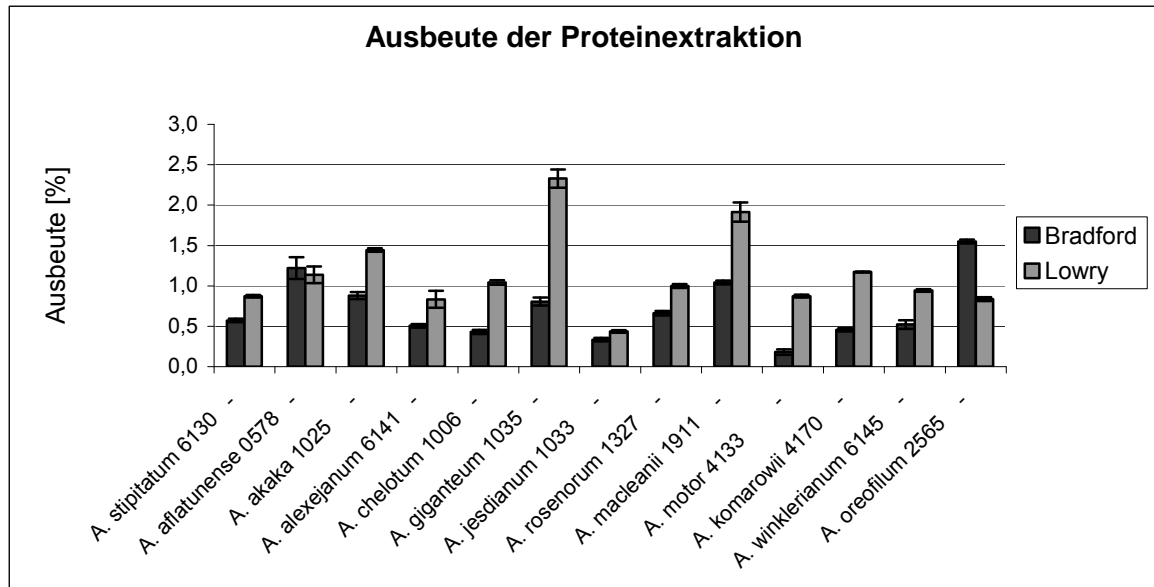


Abb. 3.7 Ausbeuten der Proteinextraktion nach Lowry und Bradford

Wie Abbildung 3.7 zu entnehmen ist, waren die Ausbeuten gemäß der Bestimmung nach Bradford in der Regel niedriger als die gemäß Lowry.

Aufgrund der großen Unterschiede der beiden Methoden untereinander ist es von großer Bedeutung, die Bestimmungsmethode für alle Ergebnisse anzugeben. Alle in dieser Arbeit angegebenen Proteinkonzentrationen und Aktivitäten, sofern nicht anders angegeben, basieren auf den Ergebnissen der Bestimmungsmethode nach Lowry.

### 3.2.1.2 Proteingelanalytik

Es wurden denaturierende Elektrophoresegele der Rohextrakte angefertigt, um die Proteinbanden der einzelnen Arten miteinander zu vergleichen. Die Proteingele wurden entsprechend Kapitel 2.6.4 angefertigt und mit Coomassie Blue gefärbt.

#### 3.2.1.2.1 Vergleich unterschiedlicher Arten

Die Ergebnisse sind für einige Arten in Abbildung 3.8 dargestellt. Typisch für den Subgenus *Melanocrommyum* ist die Region zwischen 23 und 31 kDa. Hier befinden sich je nach Spezies zwei oder mehr intensive Banden. Diese Banden sind in Arten anderer Untergattungen nicht nachzuweisen. Exemplarisch hierfür ist in Abbildung 3.8 auch das Proteinmuster von *A. sativum* abgebildet (Reihe 14). Einige Arten wie *A. giganteum*, *A. rosenorum*, *A. chelotum*, *A. motor*, *A. aflatunense* und *A. christophii* (Reihe 1 bis 6) gehören zu den Spezies, die nur zwei sehr intensive, breite Banden in diesem Bereich zeigen. Arten mit nur einer Bande zwischen diesen beiden intensiven Banden sind *A. macleanii*, *A. komarowii* und *A. alexejanum* (Reihe 7 bis 9). Dagegen gehört *A. jesdianum*, *A. winklerianum*, *A. stipitatum* und *A. akaka* (Reihe 10 bis 13) zu jenen Arten, die über zwei oder mehrere kleinere Banden zwischen den Hauptbanden

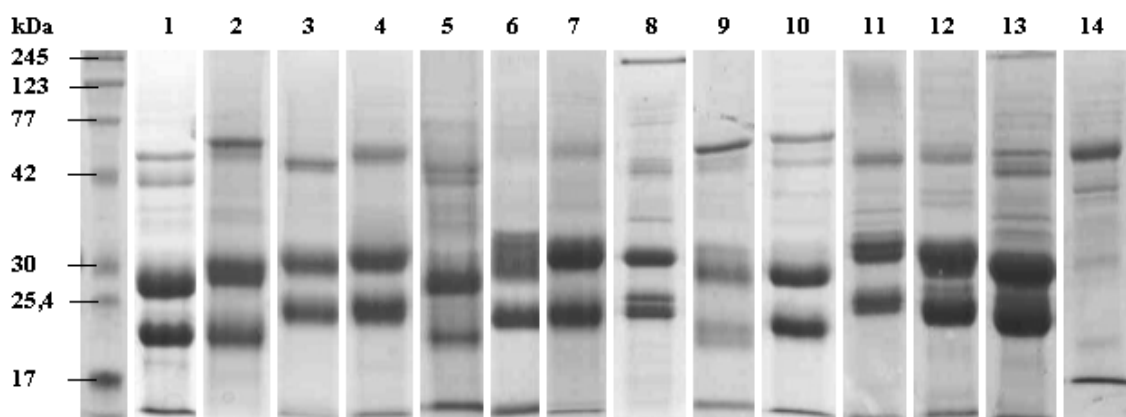


Abb. 3.8: SDS Gel: Vergleich der Rohextrakte: Reihe 1: *A. giganteum* (1035), Reihe 2: *A. rosenorum* (1869), Reihe 3: *A. chelotum* (1006), Reihe 4: *A. motor* (4133), Reihe 5: *A. aflatunense* (0578), Reihe 6: *A. christophii* (0004), Reihe 7: *A. macleanii* (2218), Reihe 8: *A. komarowii* (4170), Reihe 9: *A. alexejanum* (6141), Reihe 10: *A. jesdianum* (1033), Reihe 11: *A. winklerianum* (6145), Reihe 12: *A. stipitatum* (6130), Reihe 13: *A. akaka* (1025), Reihe 14: *A. sativum*

verfügen. Hierzu ist anzumerken, dass die Auswertung besonders bei mehreren Zwischenbanden schwierig ist, da meist schon die Hauptbanden sehr intensiv und vor allem breit sind. Es ist daher auch nicht auszuschließen, dass sich bei einigen Arten unter den breiten Banden Doppel- oder Mehrfachbanden befinden oder das schwächere Banden überdeckt werden.

Die zweite interessante Region in Proteingelen von *Allium*-Arten ist der Bereich zwischen 43 und 59 kDa. In Abbildung 3.8 ist zu erkennen, dass dieser Bereich für *A. sativum* sehr charakteristisch ist. Hier befinden sich üblicherweise die Alliinase-Untereinheiten, die typisch für die meisten *Allium*-Arten sind, und in diesen die intensivsten Banden darstellen. Die Knoblauch-Alliinase ist gut dokumentiert und untersucht. Sie besteht aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 53,5 kDa. Für andere Arten können die Größen der Untereinheiten leicht variieren. Aus Abbildung 3.8 wird ersichtlich, dass in diesem Bereich in allen Proben des Subgenus *Melanocrommyum* Doppel- oder Dreifachbanden zu beobachten sind. Die Alliinase-Untereinheiten sind wesentlich weniger stark ausgeprägt als der oben beschriebene Bereich zwischen 23 und 32 kDa. Möglicherweise liegt die Alliinase hier also in einer anderen Form vor als in Arten anderer Subgenera. Die Mehrfachbanden lassen auf heterogene Alliinase-Untereinheiten schließen, nicht auf homogene Untereinheiten wie das aus Knoblauch isolierte Enzym. Es können hingegen auch andere Proteine außer der Alliinase für diese Banden verantwortlich sein. In den meisten Arten sind zusätzlich mehrere Banden zwischen 32 und 40 kDa zu erkennen.

#### 3.2.1.2.2 Vergleich innerhalb einzelner Arten

Auffällig sind die Unterschiede, die innerhalb Zwiebeln einer Art auftreten. Beispiele hierfür sind in Abbildungen 3.9 und 3.10 wiedergegeben. Abbildung 3.9 zeigt vier verschiedene Proben von *A. giganteum*: Reihe 1 zeigt einen 8 Monate alten Extrakt von *A. giganteum* aus dem Iran. Die Zwiebel wurde vor der Aufarbeitung nur wenige Wochen gelagert, es trat bei der Aufarbeitung keine Rotfärbung auf. Daher wurde 8 Monate später ein neuer Extrakt angefertigt. Hierbei entwickelte sich sofort die typische rote Färbung (Reihe 2). Das ungewöhnliche Verhalten kann häufiger beobachtet werden. Nur kurz gelagerte Zwiebeln zeigen manchmal bei der Verletzung der Zellstruktur keine Verfärbung. Diese Fähigkeit erlangen sie erst nach einer längeren Lagerung von einigen Monaten wieder [Keusgen, pers. Mitteilung]. Für das ungewöhnliche Verhalten konnte noch keine Erklärung gefunden werden. Beim

Vergleich dieser beiden Proben (Reihen 1 und 2) sind einige Unterschiede zu beobachten. Die erste Probe zeigt zwei distinkte Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 42 und 55 kDa. Im Bereich zwischen 35 und 40 kDa kommen mehrere schwache Banden vor. Unterhalb der beiden intensiven, charakteristischen Banden bei 28 und 21 kDa tritt noch eine weitere Bande bei ca. 18 kDa auf. In der frisch aufgearbeiteten Probe (Reihe 2) sind die beiden höhermolekularen Banden näher zusammengedrückt. Sie liegen hier bei ca. 43 und 50 kDa. Die untere Bande bei 18 kDa ist verschwunden.

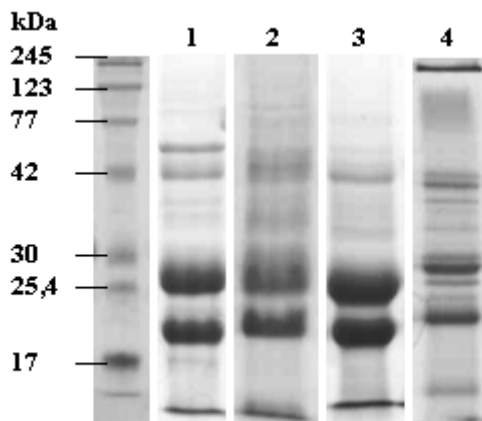


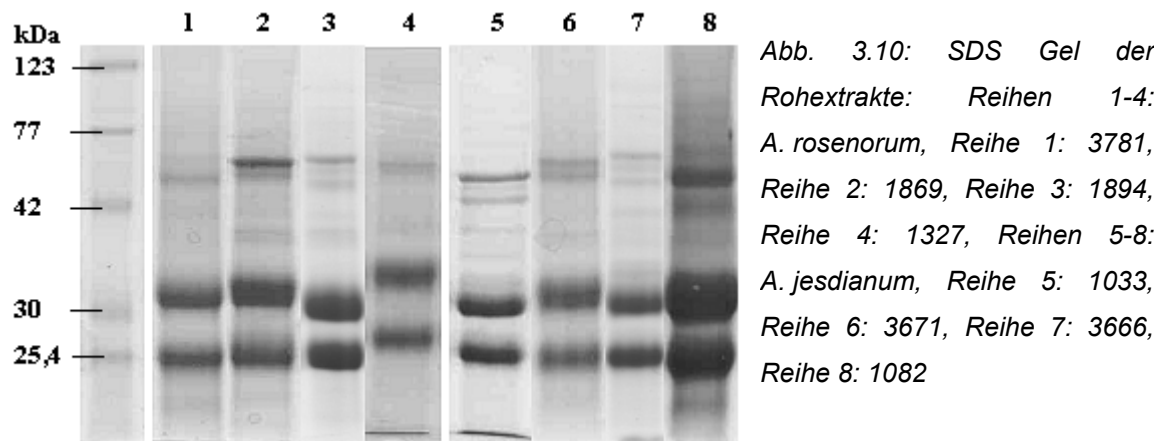
Abb. 3.9: SDS Gel der Rohextrakte: Reihe 1: *A. giganteum*, Iran, 8 Monate alter Extrakt (1035), Reihe 2: *A. giganteum*, Iran, frischer Extrakt (1035), Reihe 3: *A. giganteum*, Tadschikistan (6089, Reihe 4: *A. giganteum*, Usbekistan (4165),

Die Reihen 3 und 4 zeigen weitere Proben von *A. giganteum* aus Tadschikistan (Reihe 3) und aus Usbekistan (Reihe 4). In der dritten Probe aus Tadschikistan (Reihe 3) ist die 42 kDa Bande intensiver als die anderen unspezifischen Banden. Oberhalb treten schwächere Banden bei ca. 50 und 55 kDa auf. Auch hier befinden sich schwache Banden zwischen 35 und 40 kDa, die Bande bei 18 kDa ist nicht zu erkennen.

Die Probe aus Usbekistan (Reihe 4) zeigt ein vollkommen anderes Bild. Die beiden charakteristischen Banden sind hier wesentlich schärfer erkennbar als in den anderen Proben. Die intensivsten Banden befinden sich hier bei ca. 29 und 22 kDa. Diese sind zwar stark, aber im Gegensatz zu anderen Proben sehr schmal. Zwischen diesen beiden Banden können deutlich drei weitere Banden bei 28, 24 und 23 kDa erkannt werden. Direkt über der größeren Bande tritt eine weitere mit einem Molekulargewicht von 30 kDa auf. Im höhermolekularen Bereich befinden sich ebenfalls einige gut abgetrennte Banden. Die intensivste Bande ist bei ca. 40 kDa, schwächere sind bei 42, 38 und 34 kDa sichtbar. Des weiteren tritt eine sehr untypische Bande bei ca. 15 kDa auf.



Abbildung 3.10 zeigt die Proteingele verschiedener Proben der beiden nahe verwandten Arten *A. rosenorum* und *A. jesdianum*. Die Banden 1 bis 4 zeigen Proben der Spezies *A. rosenorum* und die Banden 5 bis 8 Proben von *A. jesdianum*. An diesen Beispielen soll die Unterschiedlichkeit von Proben dokumentiert werden, die aus verschiedenen Ursprungsregionen stammen, jedoch unter analogen Bedingungen gewachsen sind.



Die ersten vier Proben der Spezies *A. rosenorum* stammten alle aus der Lebendpflanzenkollektion des IPK Gatersleben. Hier wurden Teile der in den Ursprungsländern gesammelten Proben kultiviert, um die Arten zu konservieren und um taxonomische Nachbestimmungen zur Bestätigung der Zuordnung zu ermöglichen. Alle dargestellten Proben zeigen die charakteristische Doppelbande im Bereich von 24 bis 32 kDa. Dennoch ist ersichtlich, dass Zwiebeln aus der gleichen Art, die unter analogen Bedingungen gewachsen sind, deutliche Unterschiede aufweisen können. Um diese zu erklären, muss die ursprüngliche Herkunft des Pflanzenmaterials, das nachgezüchtet wurde, betrachtet werden. Die Nachzucht in Bande 1 stammte von einem niederländischen Exporteur für Blumenzwiebeln (Hoog & Dix Export, Heemstede, Niederlande). Die anderen *A. rosenorum* Proben stammten ursprünglich aus Sammelreisen in Tadschikistan. Probe 2 wurde auf einer Sammelreise 1986 im Schutzgebiet „Ramit“ an einem Seitenfluss des Karfirnigan geerntet. Probe 3 stammte von der selben Expedition und wurde im linken Seitental des Varzob, oberhalb von Kondora gesammelt. Die vierte Probe wurde 1984 im Siema-Tal nördlich von Dushanbe an einem Geröllhang gefunden.

Probe 1 zeigt eine schwache Bande bei ca. 55 kDa sowie sehr schwache Banden bei ca. 60 kDa, 35 bis 40 kDa und 18 kDa. Probe 2 hat eine intensive Bande bei ca. 60 kDa und eine etwas schwächere Bande bei ca. 55 kDa. Weitere, schwächere Banden sind bei ca. 38 kDa, bei 27 kDa und eine sehr schwache bei ca. 18 kDa. Probe 3 zeigt eine intensivere Bande bei 60 kDa und darunter eine schwächere Doppelbande bei ca. 53 und 55 kDa. Auch sind mehrere schwächere Banden bei ca. 38 kDa zu erkennen, aber keine bei 18 kDa. Probe 4 enthält eine Doppelbande bei 57 und 60 kDa und mehrere schwache Banden bei ca. 38 kDa.

Die Proben der Spezies *A. jesdianum* sind in den Reihen 5 bis 8 wiedergegeben. Die erste Probe (Reihe 5) stammte hierbei vom Originalstandort im Iran, die drei anderen waren Nachwuchse aus Gatersleben. Bei den Proben 2 bis 4 handelte es sich um Vertreter der Subspezies *angustitepalum*, bei Probe 1 um die Subspezies *A. jesdianum* Boiss et Buhse. Die zweite (Reihe 6) und dritte Probe (Reihe 7) stammten ursprünglich aus dem Kugitang-Gebirge in Usbekistan und wurden 1993 gesammelt. Beide wuchsen ca. 20 km westlich von Gulistan, im Tal von Baglidarasai, Probe 2 an verschiedenen Stellen im oberen Teil des Tales, Probe 3 an westexponierten Hängen des Tales auf lehmigem Kalkschotter. Probe 4 wurde vom Botanischen Garten Göteborg bezogen und stammte ursprünglich aus Afghanistan. Der genaue Ursprungsort ist nicht bekannt.

Auch hier zeigen alle Proben die charakteristische Doppelbande bei 25 und 32 kDa. Die Probe aus dem Iran (Reihe 5) enthält außerdem eine relativ intensive Bande bei ca. 55 kDa und eine schwächere bei ca. 50 kDa sowie weitere schwache Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 53 kDa, 38 kDa, 35 kDa und 33 kDa. In Reihe 6 ist eine relativ starke Doppelbande bei 55 und 60 kDa zu erkennen. Mehrere eher schwache Banden liegen zwischen 35 und 40 kDa, eine sehr schwache bei 18 kDa. Die dritte Probe (Reihe 7) zeigt eine Dreifachbande bei 53, 55 und 60 kDa. Zusätzliche Banden sind bei 44 und zwischen 35 und 40 kDa zu erkennen. Die Probe in Reihe 8 hat eine intensive Bande bei ca. 55 kDa sowie etwas schwächere bei 60, 44 und 18 kDa. Schwächere Banden treten bei ca. 38 kDa auf.

### **3.3 Aufreinigung eines unbekannten Enzyms**

Zum Verständnis der zur Bildung des Farbstoffes führenden biochemischen Vorgänge in der Pflanze musste das beteiligte Enzym aufgereinigt und charakterisiert werden. Da bisher nichts über dieses Enzym bekannt war, wurden verschiedene Methoden zur Aufreinigung getestet. Die Ergebnisse von zwei Aufreinigungsmethoden sollen hier beschrieben und ausgewertet werden. Für beide Methoden wurden Zwiebeln der Spezies *A. macleanii* verwendet. Verschiedene Proben dieser Spezies mussten im Laufe der Methodenentwicklung aufgearbeitet werden. Ausgangspunkt für beide Aufreinigungsverfahren waren die nach Kapitel 2.6.1 hergestellten dialysierten Rohextrakte. Deren Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Die Enzymaufreinigung basierte auf einer Kombination aus Gel- und Affinitätschromatographie. Die Gelchromatographie wurde hierbei als erster Aufreinigungsschritt in beiden Methoden eingesetzt.

#### **3.3.1 Enzymaufreinigung: Gelchromatographie**

Zunächst wurde eine Sephadex-G25 Säule zur Vorreinigung und zum Entfernen des Farbstoffes verwendet. Der Farbstoff in den Protein-Rohextrakten retardierte auf der Säule und konnte trotz intensivem Spülen und Reinigen der Säule nach einigen Trennungen nicht mehr entfernt werden. Es traten schmierig ölige, schwarze Polymerisationsprodukte auf, welche die Trennleistung der Säule verringerten und zu erhöhtem Gegendruck führten.

Die Aufreinigung erfolgte im Anschluss an einer Superose-12 Säule, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben. Die Fließmittelbedingungen wurden auf eine optimale Trennung und gute Enzymstabilität optimiert. Die Zugabe von NaCl zu dem Phosphatpuffer führte zu einer höheren Aktivität der Fraktionen und zu einer schnelleren Regeneration des Enzyms. Die aktiven Fraktionen konnten über den in Kapitel 2.6.2 beschriebenen optischen Schnelltest bestimmt werden. Dazu wurden die einzelnen Fraktionen mit dem enzyminaktivierten niedermolekularen Extrakt versetzt. Eine schnelle, innerhalb von maximal 5 Minuten eintretende rote Farbreaktion zeigte Enzymaktivität an. Eine weitere Aufreinigung mit anderen gelchromatographischen Säulenmaterialien war aufgrund der in einem engen Bereich liegenden Molekulargewichte (100 bis 130 kDa) nicht möglich. Die aktiven Fraktionen wurden

aufkonzentriert und zur Verbesserung der Stabilität und der Aktivität mit Pyridoxal-5'-Phosphat Lösung (0,1 mM Endkonzentration) versetzt und bei 4°C gelagert.

Äquivalente Ergebnisse ließen sich auch mit einer Aufreinigung über eine Fractogel TSK-HW-55(S) Säule (Kapitel 2.7.1) mit dem gleichen Puffer erzielen. Die Bestimmung der aktiven Fraktionen erfolgte ebenfalls über die Reaktion mit niedermolekularem enzyminaktivierten Extrakt. Diese wurden aufkonzentriert, mit Pyridoxal-5'-Phosphat Lösung (0,1 mM Endkonzentration) versetzt und bei 4°C gelagert.

### **3.3.2 Proteinfraktion A**

#### *3.3.2.1 Enzymaufreinigung: Affinitätschromatographie über eine Con A Säule*

Die weitere Aufreinigung konnte mit einer Affinitätschromatographie erreicht werden. Die in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Ergebnisse der Proteingelbestimmungen ließen auf größere Mengen Glykoprotein in der Probe schließen. Aus diesem Grund sollte zunächst eine Methode zur Abtrennung von Glykoproteinen getestet werden. Hierzu wurde eine Säule mit an Agarose immobilisiertem Concanavalin A (Con A) verwendet. Con A bindet mit hoher Affinität spezifisch an  $\alpha$ -D-Mannose- und  $\alpha$ -D-Glucose-haltige Kohlenhydrate, aber auch mit geringerer Affinität an andere Zucker [Kanellopoulos et al. 1996]. Die Bindung an Mannose ist hierbei stärker als an Glukose, an oligo- und polymere Kohlenhydrate stärker als an Monomere. Hier erfolgt die Bindung bevorzugt an den Kettenenden [Goldstein et al. 1965]. Zur Elution des reversibel gebundenen Enzyms wurde eine 0,4 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannosepyranosid-Lösung verwendet (eine Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 2.7.2). Die Affinität des Con A zu Mannose war hoch und wurde durch die eingefügte Methylgruppe noch gesteigert. Die Mannose-Lösung verdrängte das Glykoenzym aus der Bindung. Niedrigere Konzentrationen konnten das Enzym nicht aus der Con A Bindung verdrängen. Zum Vergleich kann die Alliinase, ein Glykoprotein mit mehreren Mannose-Resten in der Seitenkette [Nock und Mazelis 1986], bei der Aufreinigung über eine Con A Säule mit Konzentrationen zwischen 5 und 25 mM Methyl- $\alpha$ -D-Mannosepyranosid eluiert werden. Die Bindung des gesuchten Enzyms an Con A war also sehr viel stärker als die der Alliinase. Dies könnte bedeuten, dass in der Glykoseitenkette mehr Mannose-Reste enthalten waren als in der Seitenkette der Alliinase. Eine weitere Möglichkeit wäre eine für die Bindung an Con A günstigere Anordnung der Zuckerreste.

Alliinasen aus *Allium*-Arten sind Glykoproteine, wie z.B. die sehr gut untersuchte Alliinase aus Knoblauch. Da diese wie das gesuchte Enzym ebenfalls an Con A band, konnten die beiden Proteine mit dieser Methode nicht voneinander getrennt werden. Daher wurde vor der Elution zunächst mit einer 0,2 M Methylmannoselösung gespült. Hiermit eluierte eventuell gebundene Alliinase, während das gesuchte Enzym unter diesen Bedingungen auf der Säule verblieb. Die Elution des Proteins erfolgte im Anschluss mit einer 0,4 M Methylmannoselösung. Die aktiven Fraktionen wurden konzentriert und bei 4°C gelagert.

Das Ergebnis der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE Gelen überprüft. Die Anfärbung erfolgte mittels Coomassie Blue oder Silberfärbung. Wie in Abbildung 3.11 abzulesen, sind nach der Gelchromatographie (Superose12) deutlich mehrere Banden zu erkennen (Reihe 2). Verglichen mit dem Rohproteinextrakt (Reihe 3) konnte hingegen bereits eine deutliche Aufreinigung erreicht werden. Die intensivste Bande hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Diese gehört zu den beiden intensiven Banden zwischen 23 und 32 kDa. Die kleinere der beiden Banden wird nach der Gelchromatographie schwächer. Im höhermolekularen Bereich sind noch drei weitere Banden zu erkennen (ca. 40 kDa, 55 kDa und 90 kDa). Die 55 kDa Bande ist vermutlich der Alliinase zuzuordnen.

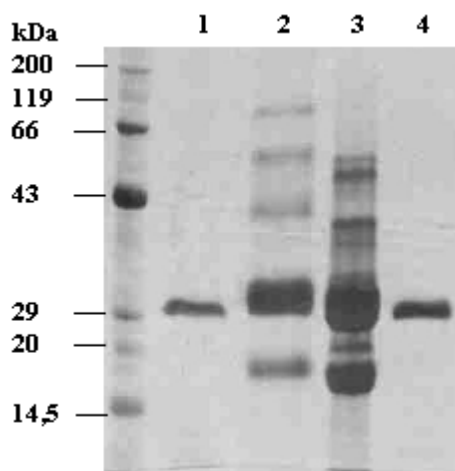


Abb. 3.11: Reihe 1: aufgereinigtes Enzym von *A. giganteum*, Reihe 2: Rohextrakt von *A. macleanii*, Reihe 3: Extrakt von *A. macleanii* nach Gelchromatographie, Reihe 4: aufgereinigtes Enzym von *A. macleanii* (Silberfärbung)

Nach der Affinitätschromatographie ist nur noch eine Bande im silbergefärbten Gel zu erkennen (Reihe 4). Diese hat ein Molekulargewicht von 30 kDa. Die gesamte Aufarbeitung wurde auch für einen *A. giganteum*-Extrakt durchgeführt. Auch hier ist nach der Affinitätschromatographie nur noch ein Bande zu erkennen (Reihe 1). Das Molekulargewicht beträgt ebenfalls 30 kDa.

Zur Vereinfachung wird das Protein, welches über die Con A Säule aufgereinigt wurde, im folgenden Proteinfraction A genannt.

### 3.3.2.2 Enzymaufreinigung: Eigenschaften des Proteinfraction A

Ein Vergleich der Retentionszeit des Enzyms mit der Retentionszeit von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht in der Gelchromatographie zeigte, dass das native Protein ein Molekulargewicht von ca. 100 – 120 kDa aufwies. Es handelt sich also um ein Homotrimer oder wahrscheinlicher um ein Homotetramer. Da eine Aufreinigung mit einer Con A-Säule möglich war, enthielt das Enzym vermutlich eine Glyko-Seitenkette mit Mannose oder Glucose. Die hohe Affinität des Enzyms zum Con A ließ auf einen hohen Mannoseanteil schließen.

Das Eluat reagierte mit einem niedermolekularen, enzyminaktivierten Extrakt von *A. macleana* zu einem roten Produkt. Es zeigte aber auch eine Polyphenoloxidase-Aktivität und oxidierte Brenzcatechinlösungen zu braunen Oxidationsprodukten. Es wurde von Pyridoxal-5'-phosphat und NaCl stabilisiert und von Aminoxy-Essigsäure, einem Alliinaseinhibitor, inhibiert. Es handelt sich also vermutlich um ein Glykoprotein mit einer Alliinase-ähnlichen Aktivität.

Mit einer Probe des aufgereinigten Enzyms aus *A. macleana* wurde eine Sequenzierung durchgeführt (Seqlab, Göttingen). Die N-terminale Sequenzierung ergab die in Tabelle 3.3 wiedergegebene Aminosäuresequenz:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	D	T	I	V	A	V	E	L	D	T	Y	P

Tab. 3.3: N-terminale Aminosäuresequenz von Proteinfraction A (Bestimmung durchgeführt von Seqlab AG, Göttingen)

Eine Datenbankrecherche (UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot + TrEMBL)) zeigte eine 100%ige Sequenzübereinstimmung mit dem Lektin Con A aus *Canavalia ensiformis*. Das an das Säulenmaterial immobilisierte Con A war also vermutlich in die Probe gelangt.

Zur Überprüfung wurde eine neu gepackte Säule in einem Blindlauf zunächst mit Phosphatpuffer, dann mit der verwendeten Mannoselösung gespült (Abb. 3.12). Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen, aufkonzentriert und mittels Gelelektrophorese untersucht. Die ersten 100 ml des Phosphatpuffers enthielten ungebundenes Lektin, spätere Fraktionen nicht mehr. Da neue Säulen vor der Verwendung immer mit 150 bis 200 ml Puffer vorgespült wurden, sollte dies keine Verunreinigungsquelle sein. Danach konnten mit dem Mannosepuffer signifikante Mengen Con A von der Säule gelöst werden. Die Gesamtmenge des Mannosepuffers betrug 150 ml. Noch in der letzten Fraktion konnte Con A nachgewiesen werden.

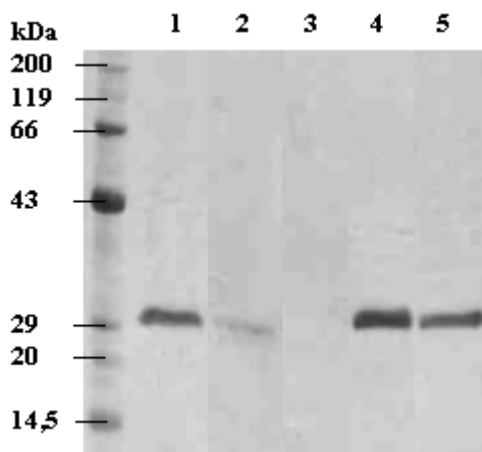


Abb. 3.12: Überprüfung der Ablösung von Con A von einer neuen Säule; Reihe 1: Phosphatpuffer Fraktion 2, Reihe 2: Phosphatpuffer Fraktion 4, Reihe 3: Phosphatpuffer Fraktion 5, Reihe 4: Methylmannosepuffer Fraktion 1; Reihe 5: Methylmannosepuffer Fraktion 2

Die vom Hersteller (Sigma) empfohlene Methylmannosekonzentration zur Elution beträgt 5 bis 500 mM. Die verwendete Methyl-Mannoselösung (0,4 M) befand sich also innerhalb der Spezifikation. Unter diesen Bedingungen sollte keine Ablösung des Säulenmaterials auftreten. Der Grund hierfür konnte nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise war die Konzentration so hoch, dass das Säulenmaterial von der Bindung an das Lektin durch die Mannose verdrängt wurde. Weiterhin möglich ist eine so feste Bindung des Con A an das Enzym, dass eine Ablösung des Enzyms nur durch eine Abtrennung des Con A von dem Säulenmaterial erreicht werden konnte. Durch die Zusammensetzung des Puffers könnte es aber auch zu einer Zerstörung der Con A-Proteinstruktur und damit zu einem Ablösen einzelner Untereinheiten gekommen sein.

Zum Vergleich wurde ein Säulenmaterial eines anderen Herstellers geprüft. Hierzu wurde an Agarose und an Sepharose immobilisiertes Con A (GE Healthcare) verwendet. Auch bei diesem Material trat das Problem auf und es zeigte ein analoges

Verhalten. Das Sepharose-Derivat schien stabiler; mit der Methylmannoselösung wurde weniger Con A eluiert. Die Stabilität war aber nicht ausreichend, um den Eintrag von Con A in die Probe zu verhindern.

Sowohl das von der Säule gelöste als auch reines Con A zeigten keine enzymatische Aktivität. Da die zur Sequenzierung verwendete Probe Enzymaktivität aufwies, muss in der Lösung auch das gesuchte Enzym enthalten gewesen sein. Bei der Sequenzierung konnte diese offensichtlich geringe Menge hingegen nicht erfasst werden. Ein weiteres Konzentrieren der Probe führte zu zusätzlichen, höhermolekularen Banden neben der 30 kDa Bande im SDS Gel. Zwei der Banden konnten mittels MALDI-TOF-MS/MS eindeutig von Con A abgegrenzt werden. Eine weitere Einordnung oder Sequenzierung dieser Banden war nicht möglich.

Eine Abtrennung des Lektins von dem gesuchten Enzym war aufgrund der ähnlichen Eigenschaften der Substanzen problematisch. Beide Proteine haben ein ähnliches Molekulargewicht, gleich große Untereinheiten und ähnliche Affinitätseigenschaften.

### **3.3.3 Proteinfraktion B**

#### **3.3.3.1. Enzymaufreinigung: Affinitätschromatographie über eine *Lens culinaris*-Lektin-Säule**

Die aktiven Fraktionen der Gelchromatographie konnten außerdem mit anderen chromatographischen Methoden aufgetrennt werden. Auch hier wurde wieder die Bindung eines Lektins an den Glykorest des Enzyms ausgenutzt (s. auch Kapitel 3.3.2). Da die Bindung der Glykoseitenkette an Con A sehr stark war, wurde ein anderes Lektin ausgewählt, das ebenfalls spezifisch an Mannose und Glucose bindet. Das Lektin der Linse (*Lens culinaris*) zeigt eine schwächere Affinität zu diesen Zuckern als Con A. Als Säulenmaterial wurde an Agarose immobilisiertes *Lens culinaris*-Lektin verwendet.

Hierzu wurde die Probe mit Phosphatpuffer auf pH 7,8 eingestellt und über die Säule gegeben (Kapitel 2.7.4). Nach dem Spülen mit Phosphatpuffer zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Proteine wurde das Enzym mit einem schrittweisen Gradienten mit steigender Methylmannose-Konzentration eluiert. Das Enzym eluierte mit schwankenden Konzentrationen zwischen 1,5 und 2,5 mM. Für die großen Schwankungen konnte keine Erklärung gefunden werden, da alle anderen Versuchsparameter konstant gehalten wurden.



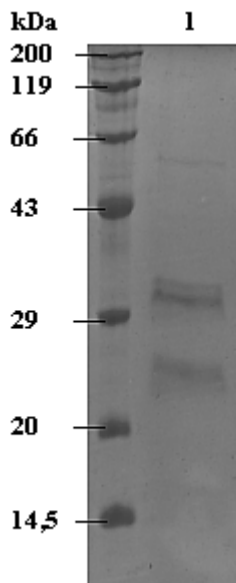


Abb. 3.13: SDS-PAGE der aktiven Fraktion nach Aufreinigung über eine *Lens culinaris*-Lektin-Säule: Bande 1: Eluat mit Mannose-Lösung

In den aktiven Fraktionen konnten im SDS Gel noch drei Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa, 30 kDa und 25 kDa nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich vermutlich um die beiden charakteristischen Banden der Untergattung und die Alliinase-Untereinheiten, die ebenfalls an die Lektin-Säule binden sollten (Abb. 3.13).

#### 3.3.3.2 Enzymaufreinigung: Metall-chelat-Komplex Chromatographie an einer Nickel-Säule

In einem nächsten Schritt wurde eine Metallionen-Affinitätschromatographie an einer Nickel-Sepharose-Säule verwendet. Diese Säulen werden normalerweise eingesetzt um Histag-Proteine aufzureinigen. Nickel bildet mit bestimmten Aminosäuren wie Histidin Metall-Chelat Komplexe. Die Histidinreste am Ende der Proteinsequenz der Histag Proteine sind sterisch gut zugänglich und können aufgrund der hohen Affinität gut an Nickel binden. Proteine, bei denen Histidin an der Oberfläche der quaternären Proteinstruktur exponiert vorliegt, können auch mit dieser Methode aufgereinigt werden. Hier ist die Bindung schwächer als bei Proteinen mit Histag; bei entsprechender Anzahl und räumlicher Orientierung ist eine stabile Bindung dennoch möglich. Die Elution der Proteine erfolgt über einen imidazolhaltigen Puffer. Das Imidazol verdrängt aufgrund der höheren Affinität das Histidin aus der Komplexbindung, das Enzym eluiert.

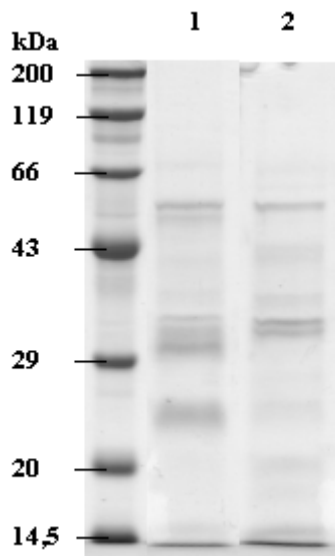


Abb. 3.14: SDS-PAGE der beiden aktiven Fraktionen nach Aufreinigung über eine Gelchromatographie und Ni-Chelat-Säule: Reihe 1: aktive Fraktion (Imidazol), Reihe 2: aktive Fraktion (pH-Gradient)

Die Probenaufgabe erfolgt bei Histag-Proteinen in einem Puffer der geringe Mengen Imidazol (20 mM) enthält, um unspezifische Bindung durch andere Proteine, z.B. aus dem Zellmaterial, zu unterbinden. Diese Methode eignete sich für das vorliegende Trennproblem nicht, da durch die geringe Menge Imidazol im Bindepuffer die relativ schwache Bindung des nativen Proteins inhibiert wurde. Die Proteinrohlösung wurde daher mit einem Phosphatpuffer pH 7,8 verdünnt und mit geringer Fließgeschwindigkeit über die Säule gegeben (Methode beschrieben in Kapitel 2.7.4). Zur Elution konnte ein Phosphatpuffer mit Imidazol (20 mM) verwendet werden. Die Kontrolle der Ergebnisse dieser Methode erfolgte mit SDS Gelen (Abb. 3.14, Reihe 1). In den Fraktionen sind noch mehrere Proteine enthalten. Die Aufreinigung mit der Nickel-Säule ist sehr unspezifisch und unter den gewählten Bedingungen werden viele Proteine erfasst.

Entscheidend für die Ausbildung des Komplexes ist der pH-Wert. Eine Bindung ist nur unter neutralen bis leicht basischen pH-Bedingungen möglich. Eine Verschiebung des pH-Wertes kann, je nach Art und Struktur des Enzyms, schnell zu einer Ablösung des Proteins führen. Daher wurde für die Elution ein schrittweiser pH-Gradient getestet (Methode beschrieben in Kapitel 2.7.4). Das gesuchte Enzym eluierte bei einem pH-Wert von 7,2 bis 7,0. Die gesammelten Fraktionen wurden konzentriert, auf Aktivität getestet und die Ergebnisse der Aufreinigung mittels SDS Gelen kontrolliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14, Reihe 2 wiedergegeben. Die Aufreinigung mit dem pH-Gradienten führte also zu besseren Ergebnissen. In Reihe 2 sind deutlich weniger

Proteinbanden zu erkennen als in Reihe 1. Im folgenden wurde also der pH-Gradient zur Elution verwendet.

### 3.3.3.3 Enzymaufreinigung: Kombination der Aufreinigung mit einer Nickel-Chelat- und einer *Lens culinaris*-Lektin-Säule

Zur Optimierung der Aufreinigung wurden die beiden beschriebenen Methoden miteinander kombiniert. Dazu erfolgte zunächst eine Aufreinigung mit einer Nickel-Chelat-Säule und im Anschluss eine weitere Aufreinigung der aktiven Fraktionen über eine *Lens culinaris*-Lektin-Säule. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 zusammengefasst.

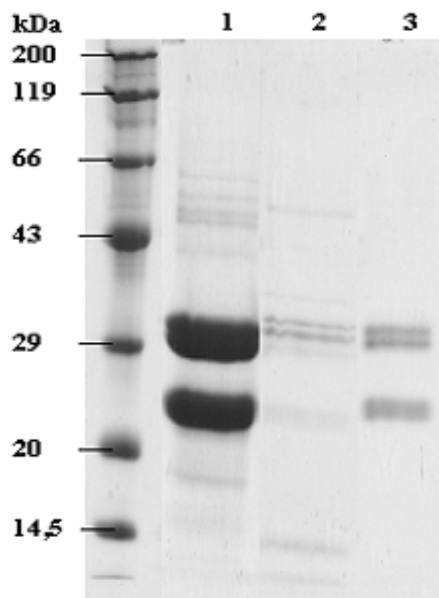


Abb. 3.15: Aufreinigung des Enzyms von *A. macleeanii*: Reihe 1: aktive Fraktion nach der Gel Chromatographie; Reihe 2: aktive Fraktion nach der Affinitäts-Chromatographie (Nickel-Sephrose-Säule); Reihe 3: aktive Fraktion nach der Affinitäts-Chromatographie (*Lens culinaris*-Lektin-Säule),

Das mit dieser Methode isolierte Protein wird im folgenden zur Vereinfachung Proteinfraction B genannt. Die Ergebnisse der Aufreinigung sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die angegebenen Aktivitäten beziehen sich auf die Alliinase-ähnliche Aktivität (Methode zur Bestimmung der Alliinase-ähnlichen Aktivität beschrieben in Kapitel 3.4.1) mit L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid, isoliert aus *A. rosenorum*, als Substrat.

Fraktion	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Protein gesamt [mg]	spez. Aktivität [nkat/mg]	Aufreinigungs-faktor	Aktivität [nkat]
Rohextrakt	15,0	1,9	28,2	109,2	/	3079,4
Gelchromatographie	5,0	0,6	2,8	868,7	8,0	2388,9
Affinitätschromatographie (Nickel)	5,0	0,2	0,8	1567,8	14,4	1175,9
Affinitätschromatographie ( <i>Lens culinaris</i> -Lektin)	3,5	0,1	0,5	1954,7	17,9	889,4

Tab. 3.4 : Ergebnisse der Aufreinigung des Enzyms mit L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid, isoliert aus *A. rosenorum* als Substrat

#### 3.3.3.4 Enzymaufreinigung: Eigenschaften der Proteinfraction B

Das isolierte Enzym bestand aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 25 und 31 kDa. Nach den Ergebnissen der Gelchromatographie betrug das Molekulargewicht des nativen Enzyms 110 bis 120 kDa. Das Enzym besteht daher vermutlich aus vier Untereinheiten, zwei mit einem Molekulargewicht von 25 kDa und zwei mit 31 kDa. Das Enzym zeigte neben der Katalyse der Bildung des roten Farbstoffes als eine Alliinase-ähnliche Reaktion auch eine Polyphenoloxidase-Aktivität. Es war allerdings unklar, welche der Untereinheiten für diese unterschiedlichen Aktivitäten verantwortlich sind.

Eine N-terminale Sequenzierung ergab die in Tabelle 3.5 wiedergegebene Aminosäuresequenz.

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
G	L	E	Q	T	F+Y	-	T	L	L	I

<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>
K	E	N	I	G	D	L+V	N	Q+K	A	D

<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>
I+V	Y	N	P	N	S	G	G	I	T	T

<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>
L	N	S/N	Q	K	L	P	I	I	(I)	Y

*Tab. 3.5: N-terminale Aminosäuresequenz Proteinfraction B (Bestimmung durchgeführt von CSL Behring)*

Die Aminosäure an Position 7 konnte nicht bestimmt werden. Möglicherweise handelt es sich daher um Cystein oder um eine andere modifizierte Aminosäure. Als Modifikation kommt beispielsweise eine Glykosylierung in Betracht.

In den Positionen 6, 18, 20 und 23 handelt es sich vermutlich um einen einfachen Nukleotid-Polymorphismus. An Position 36 ist eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, da vermutlich an dieser Stelle Serin und Asparagin miteinander austauschbar sind. An Position 43 konnte Isoleucin nicht mit absoluter Sicherheit bestimmt werden.

Ein Datenbankrecherche (UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot + TrEMBL) erbrachte keine vollständige Sequenzübereinstimmung. Die besten Übereinstimmungen (50-60%) wurden mit pflanzlichen Speicherproteinen erzielt.

### **3.4 Kinetische Parameter der isolierten Proteinfraction B**

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter des aufgereinigten Enzyms wurden, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, verschiedene Methoden verwendet, um die unterschiedlichen Aktivitäten des Enzyms zu charakterisieren. Die Alliinase-ähnliche Aktivität des Enzyms konnte über die Bildung von Pyruvat aus dem Cysteinsulfoxidrest des Substrates charakterisiert werden. Pyruvat konnte durch Umsetzung zu Laktat mit Laktatdehydrogenase unter Umwandlung von NADH zu NAD bestimmt werden. Die umgesetzte Menge Cysteinsulfoxid war hierbei direkt proportional zu der Abnahme von NADH. Diese konnte photometrisch bei 340 nm bestimmt werden.

Des weiteren zeigte das Enzym eine Polyphenoloxidase-Aktivität, die ebenfalls charakterisiert wurde. Hierzu wurden Polyphenole zu dunkelbraun gefärbten Oxidationsprodukten umgesetzt. Die Entstehung dieser Produkte konnte direkt photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm und 405 nm verfolgt werden. Da keine natürlichen Substrate bekannt waren, erfolgte die Bestimmung mit Brenzcatechin und Dopamin als Modellsubstanzen.

Als ein Summenparameter zur Entstehung des roten Farbstoffes sollten außerdem die Parameter der Farbstoffbildung direkt photometrisch bestimmt werden. Hierzu wurde der natürliche Precursor eingesetzt und mit dem Enzym umgesetzt. Die Bestimmung der Entstehung des Farbstoffes erfolgte photometrisch bei 492 nm und 540 nm.

Als kinetische Parameter sollten jeweils das Temperatur- und pH-Optimum sowie die  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte bestimmt werden. Für die Alliinase-ähnliche und die Polyphenoloxidase-Aktivität erfolgte außerdem eine Untersuchung der Substratspezifität und der Hemmung der Enzymaktivität.

#### **3.4.1 Charakterisierung der Alliinase-ähnlichen Aktivität**

Der erste Schritt der enzymatisch katalysierten Reaktion stellt vermutlich eine Alliinase-ähnliche Reaktion, also eine CS-Lyase Aktivität, dar. Daher konnte dieser Teilschritt kinetisch mit derselben Methode bestimmt werden, wie die Alliinase-Aktivität. Als Substrat diente der natürliche Precursor isoliert aus *A. rosenorum* (Kapitel 2.5).

Die Aktivität wurde, wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben, über die Umsetzung des entstehenden Pyruvats unter Verbrauch von NADH photometrisch bei 340 nm bestimmt.

### 3.4.1.1 Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte entsprechend Kapitel 2.8.2. Hierzu wurde die Aktivität abhängig vom pH-Wert für verschiedene Puffersysteme bestimmt.

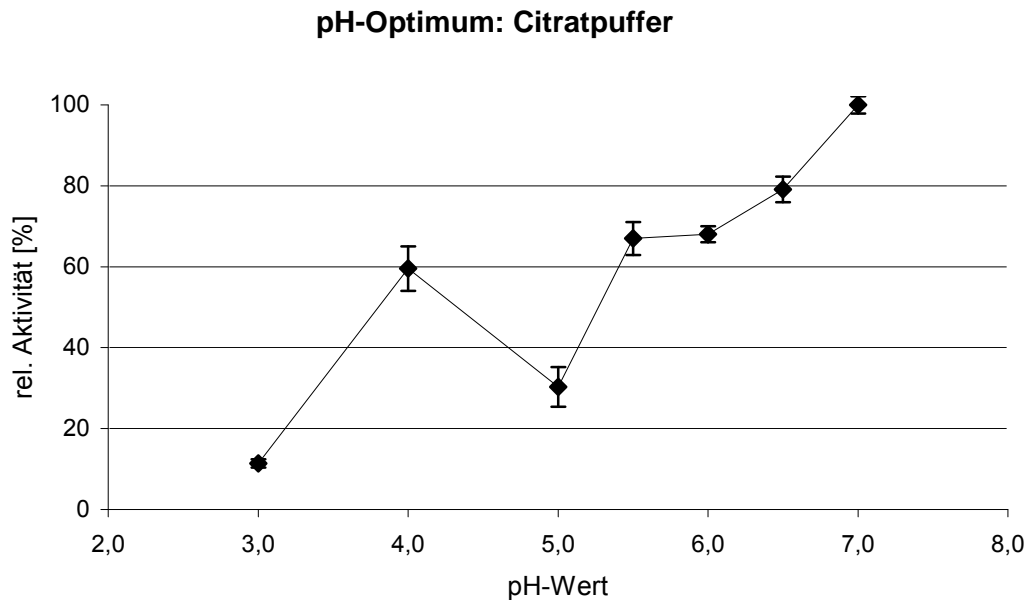


Abb. 3.16: Abhängigkeit der relativen Alliinase-ähnlichen Aktivität vom pH-Wert (Citratpuffer)

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität konnte für die sauren pH-Werte mit einem Citratpuffer bestimmt werden. Wie in Abbildung 3.16 zu erkennen, nimmt die Aktivität mit steigendem pH-Wert zu. In diesem Puffersystem konnte die höchste Aktivität bei pH 7,0 bestimmt werden. Auffällig ist das zweite Maximum bei pH 4,0. Hier liegt die relative Aktivität bei 59,5% und befindet sich damit in einem relativ niedrigen Bereich.

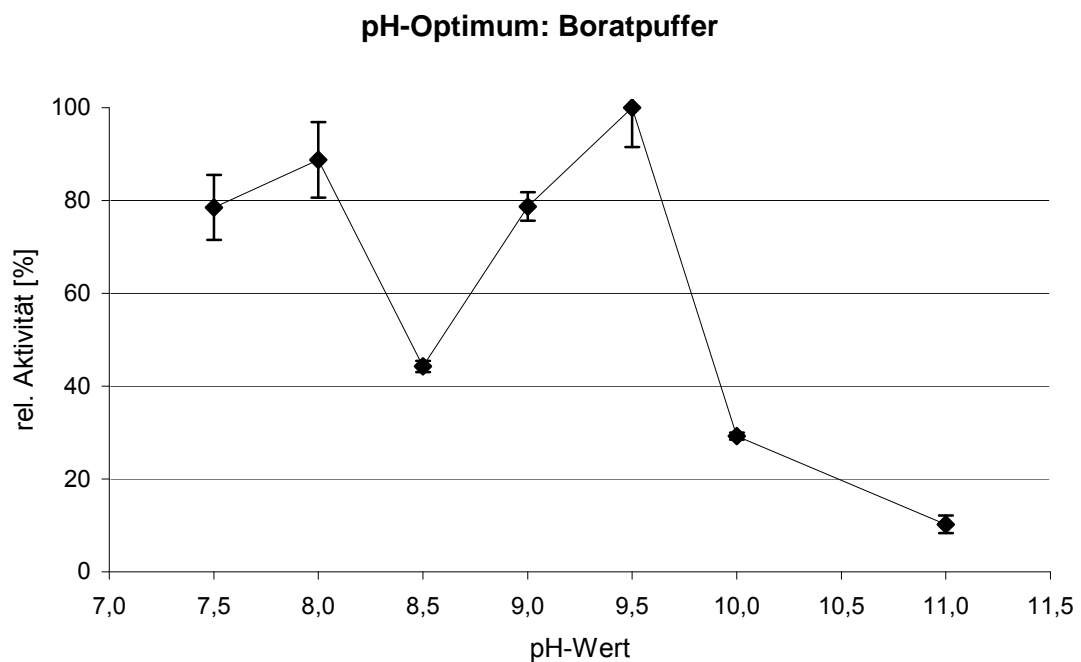


Abb. 3.17: Abhängigkeit der relativen Allinase-Aktivität vom pH-Wert (Boratpuffer)

Das pH-Optimum im alkalischen Bereich wurde mit einem Boratpuffer ermittelt. Abbildung 3.17 zeigt ein Maximum bei pH 9,5 und ein zweites bei pH 8,0. Die relative Aktivität am zweiten Maximum liegt nur um 12% niedriger als beim absoluten Maximum.

Die Bestimmung der relativen Aktivitäten im neutralen pH-Bereich erfolgte mit einem Phosphatpuffer. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen für die verschiedenen Pufferbereiche zeigte große Sprünge in der Aktivität an den Grenzen der einzelnen Puffer. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten, wurde der Phosphatpuffer nicht nur für die mittleren, neutralen pH-Werte verwendet, sondern zusätzlich für eine Messreihe über den gesamten pH-Bereich von pH 3 bis pH 11. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.18 zusammengefasst.



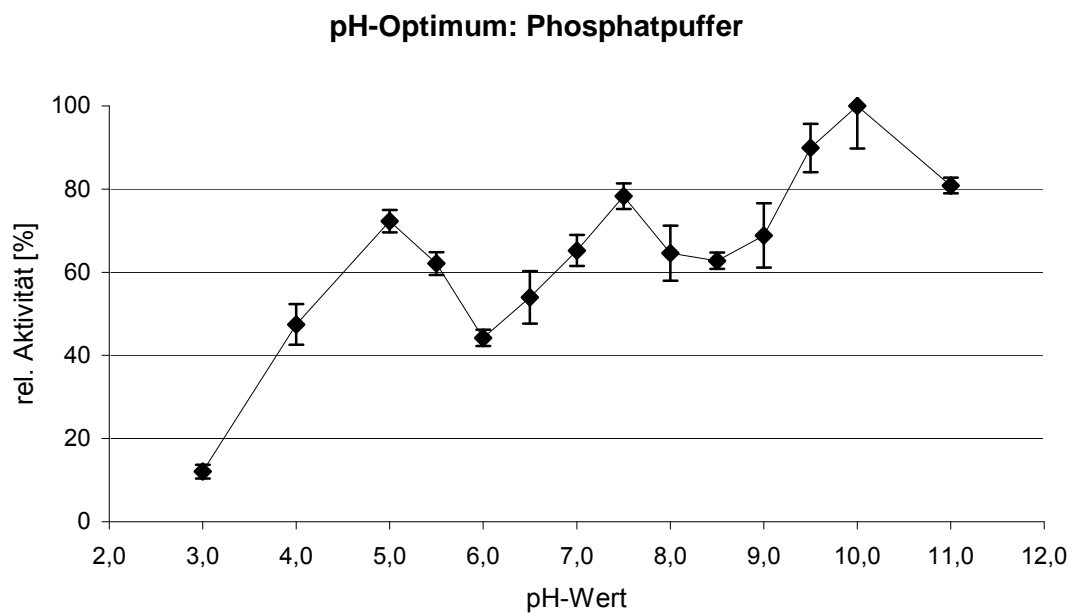


Abb. 3.18: Abhängigkeit der relativen Alliinase-Aktivität vom pH-Wert (Phosphatpuffer)

Das Optimum des pH-Wertes bestimmt in Phosphatpuffer liegt damit bei pH 10,0. Zwei weitere Maxima befinden sich bei pH 7,5 und pH 5,0. Diese lagen mit einer relativen Aktivität von 78,3%, bzw. 72,3% nur wenig unter dem Optimum. Da der Precursor bei basischen pH-Werten nicht-enzymatisch zu dem Farbstoff reagiert, sind die hohen Aktivitätswerte bei pH 10 vermutlich auf diese Reaktion zurückzuführen und nicht auf die enzymatische Reaktion.

#### 3.4.1.2 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Die Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben durchgeführt. Der Temperaturbereich betrug 18 bis 40°C. Abbildung 3.19 zeigt den temperaturabhängigen Aktivitätsverlauf für die Alliinase-ähnliche Aktivität.

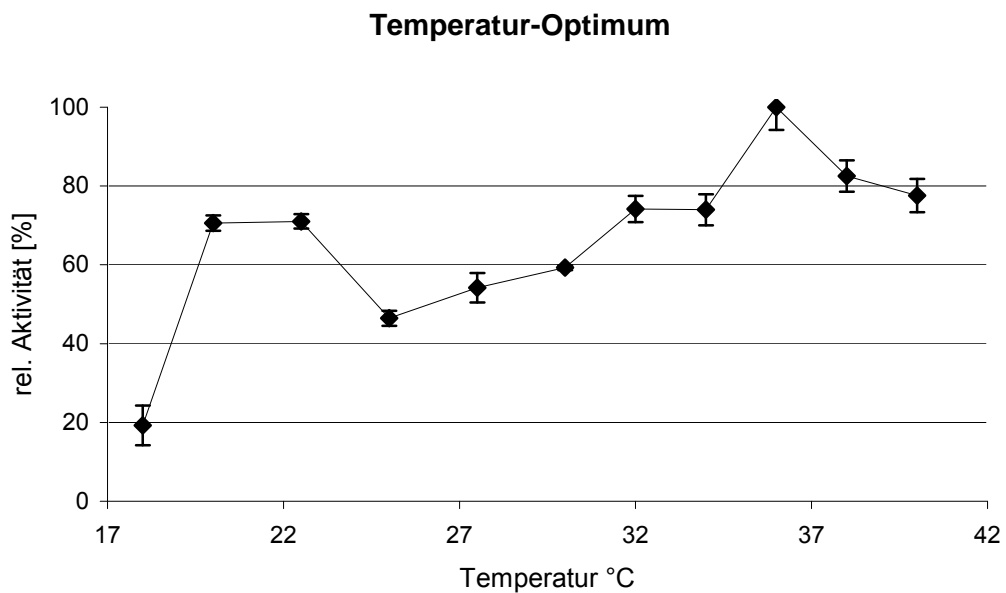


Abb. 3.19: Abhängigkeit der relativen Alliinase-Aktivität von der Temperatur (bei pH 7,5)

Das Temperatur-Optimum wurde bei pH 7,5 bestimmt und liegt bei 36°C, ein zweites, kleineres Maximum zwischen 20 und 22,5°C. Die Aktivität steigt von 18 auf 20°C steil an, nämlich von 19,2% auf 70,6%. Bei 25°C sinkt die Aktivität wieder auf 46,4%, um dann langsam bis zum Maximum bei 36°C zu steigen. Bei höheren Temperaturen nimmt die Aktivität dann wieder langsam ab.

#### 3.4.1.3 Michaelis-Menten-Kinetik

Entsprechend Kapitel 2.8.4 wurde die Michaelis-Menten Konstante  $K_m$  und die maximale Enzymaktivität  $V_{max}$  für die Alliinase-ähnliche Aktivität bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte sowohl mit der Methode nach Lineweaver-Burk als auch nach Hanes. Als Substrat diente auch hier der natürliche Precursor isoliert aus *A. rosenorum* (Kapitel 2.5). Die Konzentration der eingesetzten Lösung konnte mittels HPLC nach Derivatisierung mit OPA (Methode beschrieben in Kapitel 2.4) ermittelt werden. Als Standard zur Kalibrierung wurde Alliin verwendet. Die Abbildungen 3.20a/b und 3.21a/b zeigen die Messwerte graphisch aufgearbeitet nach beiden Verfahren.

## Lineweaver-Burk-Diagramm

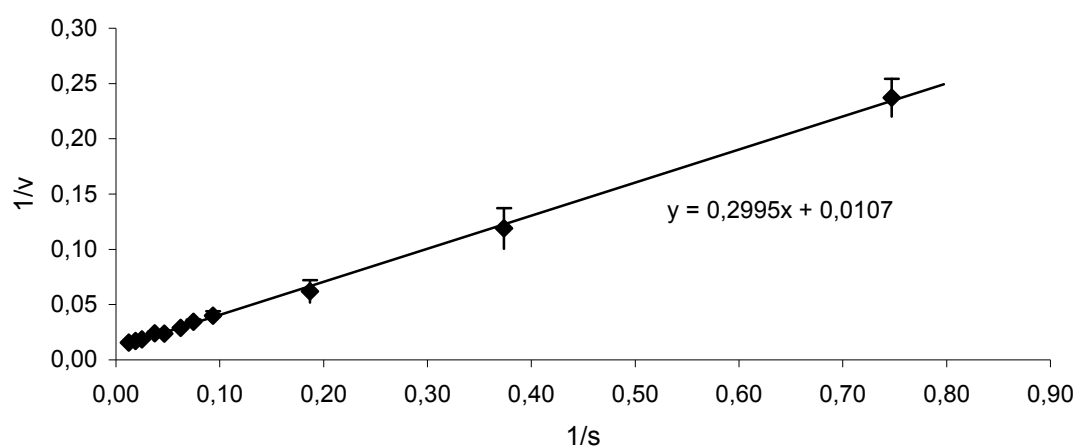


Abb. 3.20a: Lineweaver-Burk Diagramm der Alliinase-ähnlichen Aktivität

## Lineweaver-Burk-Diagramm (Ausschnitt)

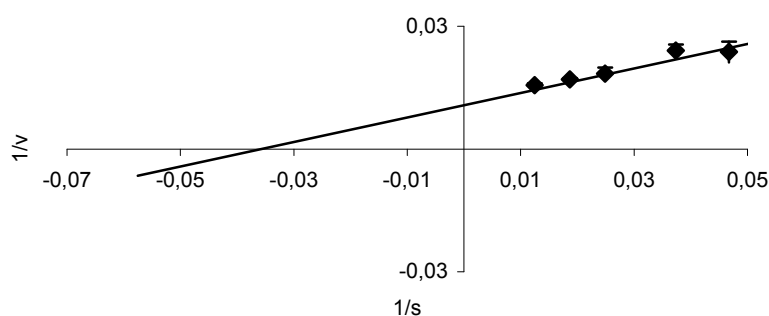


Abb. 3.20b: Lineweaver-Burk Diagramm der Alliinase-ähnlichen Aktivität (Ausschnitt)

Die gemessenen Aktivitäten für unterschiedliche Konzentrationen korrelierten gut in der Auftragung nach Lineweaver-Burk (Abb. 3.20a und 3.20b). Die Gleichung der Regressionsgeraden ist in der Abbildung 3.20a wiedergegeben. Der Schnittpunkt mit der x- und der y-Achse kann in der Vergrößerung des Schnittbereiches mit der Geraden überprüft und mit der Kalibriergeraden berechnet werden. Mit diesen Werten und der Steigung der Regressionsgeraden ließen sich die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  nach Kapitel 2.8.4 berechnen.

## Hanes-Diagramm

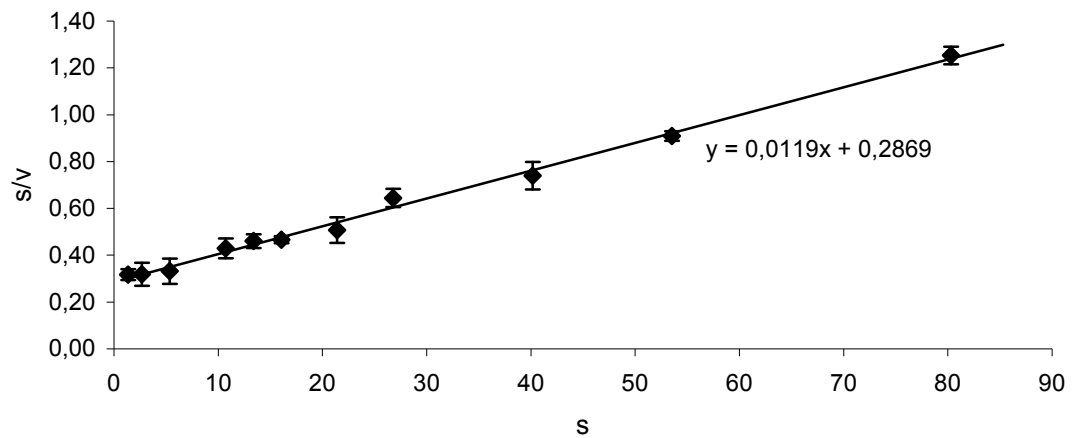


Abb. 3.21a: Hanes Diagramm der Alliinase-ähnlichen Aktivität

## Hanes-Diagramm (Ausschnitt)

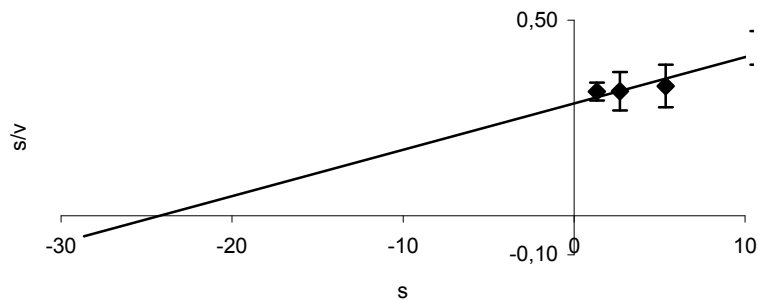


Abb. 3.21b: Hanes Diagramm der Alliinase-ähnlichen Aktivität (Ausschnitt)

Auch für die Auftragung nach Hanes korrelierten die Werte gut (Abb. 3.21a und b). Aus den Schnittpunkten mit den Achsen und der Regressionsgeraden ließ sich auch hier  $K_m$  und  $V_{max}$  bestimmen. Die berechneten Werte sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]
<b>Lineweaver-Burk</b>	$2,80 \cdot 10^{-5}$	93,40
<b>Hanes</b>	$2,42 \cdot 10^{-5}$	84,34

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Bestimmung von  $K_m$  und  $V_{max}$  der Alliinase-ähnlichen Aktivität nach Lineweaver-Burk und Hanes

Die nach Lineweaver-Burk berechneten Werte waren mit einem  $K_m$ -Wert von  $2,80 \cdot 10^{-5}$  mol/l und einem  $V_{max}$ -Wert von 93,4 nkat/mg etwas höher als die nach Hanes berechneten Werte ( $2,42 \cdot 10^{-5}$  mol/l und 84,34 nkat/mg).

#### 3.4.1.4 Bestimmung der Substratspezifität

Die Substratspezifität wurde mit verschiedenen synthetisierten Cysteinsulfoxiden bestimmt. Eine Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 2.8.5. Da es sich bei der enzymkatalysierten Bildung des roten Farbstoffes um eine Alliinase-ähnliche Reaktion handelt, sollten einige Substrate der Alliinase getestet werden. Hierzu wurden vier der hauptsächlich vorkommenden, synthetisch zugänglichen Cysteinsulfoxide verwendet (Methiin, Alliin, Propiin und Butiin, Abb. 1.1). Zusätzlich wurden vier in der Natur nicht nachgewiesene Cysteinsulfoxide synthetisiert. Die Auswahl der Substanzen orientierte sich strukturell am natürlichen Substrat des Enzyms, dem S-Pyrrolylcysteinsulfoxid. Dabei erfolgte ein Austausch des Pyrrolrests gegen einen Pyridinyl-, Benzyl-, Furanoyl- und Thiazotylrest (Abb. 3.22). Die Synthese der Cysteinsulfoxide erfolgte nach Kapitel 2.4. Die für diese Untersuchung eingesetzten Substrate waren nicht optisch rein, es handelte sich um racemische Mischungen.

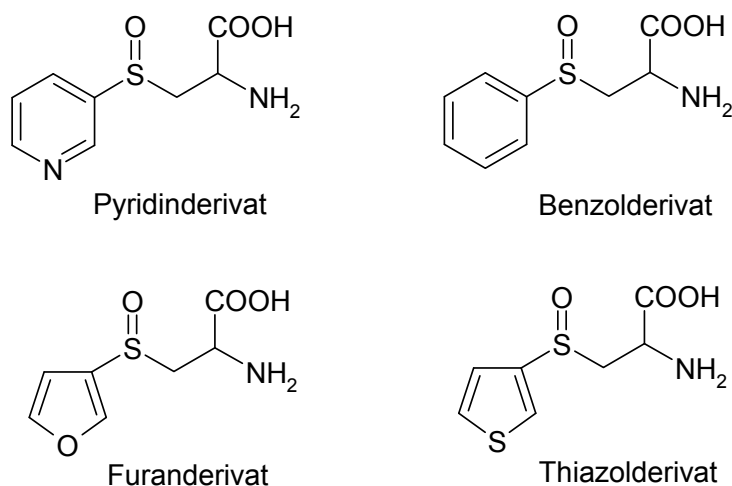


Abb. 3.22: Strukturen der eingesetzten synthetischen Cysteinsulfoxide

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung für die einzelnen Substrate sind in Abbildung 3.23 wiedergegeben. Hierbei ist zu beachten, dass die einzelnen Substrate in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden. Der natürliche Precursor, das Pyrrolylcysteinsulfoxid, hatte eine Konzentration von 80,3  $\mu\text{M}$ . Da es sich um den natürlichen, aus *A. rosenorum* isolierten Precursor handelte, standen nur begrenzte Mengen der Substanz zur Verfügung. Zusätzlich war die Spezifität für dieses Substrat, abgeleitet aus dem  $K_m$ -Wert, sehr hoch. Eine Umsetzung konnte daher schon in diesem geringen Konzentrationsbereich gut beobachtet werden. Die natürlich vorkommenden, synthetisierten Cysteinsulfoxide wurden in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Aufgrund der geringen Löslichkeit der vier nicht natürlich vorkommenden Cysteinsulfoxide konnten diese nur in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt werden. Zusätzlich ist zu beachten, dass die synthetischen Cysteinsulfoxide als Racemate vorlagen, während das isolierte Pyrrolylcysteinsulfoxid als L-(+)-Cysteinsulfoxid eingesetzt wurde.

Die Bestimmung erfolgte gemäß Kapitel 2.8.1. Die Ergebnisse der Bestimmung der Substratspezifität sind in Abbildung 3.23 zusammengefasst.

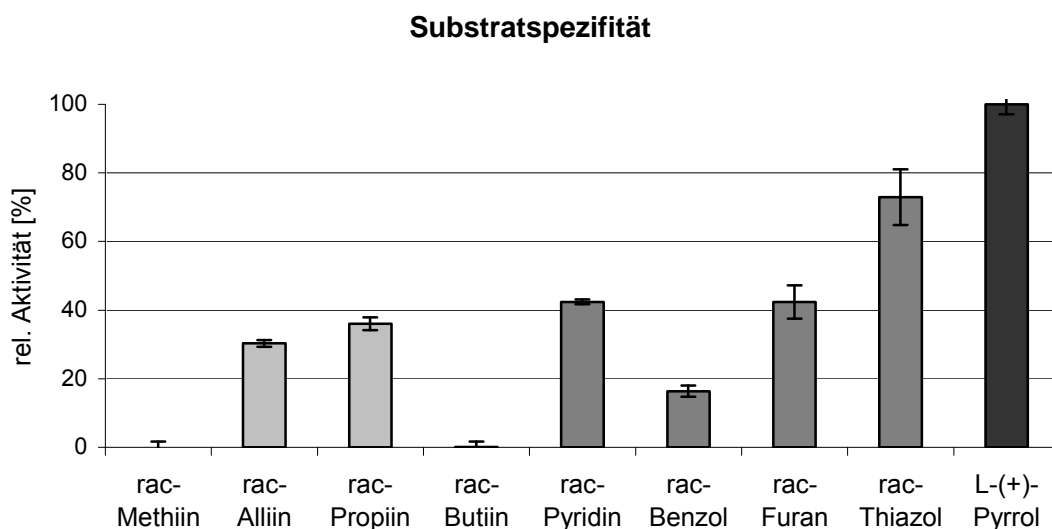


Abb. 3.23: Substratspezifität der Alliinase-ähnlichen Aktivität: Die Konzentration der eingesetzten Lösungen betrug 100 mM für Methiin, Alliin, Propiin und Butiin, 10 mM für das Pyridin-, Benzol-, Furan- und Thiazol-Derivat und 80,3  $\mu$ M für das native Substrat, das Pyrrol-Derivat

Die Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass die Umsetzung des natürlichen Substrates, des S-Pyrrolylcysteinsulfoxids, am höchsten war. Dies war aufgrund des sehr geringen  $K_m$ -Wertes von  $2,80 \cdot 10^{-5}$ , bzw.  $2,42 \cdot 10^{-5}$  mol/l zu erwarten. Interessant war die relativ hohe Umsetzung der nicht natürlich vorkommenden Cysteinsulfoxid-Derivate. Die Konzentration dieser Derivate war 124,5-fach höher als die Konzentration des natürlichen Substrates. Zu beachten ist hierbei, dass racemische Gemische der synthetisch hergestellten Cysteinsulfoxide eingesetzt wurden. In der Natur wurden dagegen bisher nur die L-(+)-Derivate nachgewiesen [Koch und Lawson 1996]. Von dem Enzym werden diese Formen daher wahrscheinlich auch unterschiedlich umgesetzt. Hierbei wird das entsprechende (-)-Derivat vermutlich schlechter umgesetzt als das (+)-Derivat oder gar nicht.

Unter diesen Bedingungen ergab sich für das Thiazolyl-Derivat eine relative Aktivität bezogen auf das Pyrrolyl-Derivat von 73,0%. Das Pyridinyl-, Furanoyl- und das Benzoyl-Derivat hatten im Gegensatz hierzu etwas geringere Aktivitäten von 42,4%, 43,0% und 16,4%. Diese waren im Vergleich zu den Aktivitäten der natürlich vorkommenden Cysteinsulfoxide noch sehr hoch. Die eingesetzten Lösungen waren

10fach konzentrierter als die der anderen Derivate. Methiin und Butiin wurden gar nicht umgesetzt, Alliin mit einer relativen Aktivität von 30,3% und Propiin mit 36,0%.

Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen und der unterschiedlichen Reinheit der eingesetzten Substrate sind die berechneten enzymatischen Aktivitäten allerdings nicht direkt miteinander vergleichbar. Die angegebenen relativen Aktivitäten sollen hier nur einen Anhaltspunkt über die Umsetzung der Substanzen geben.

#### 3.4.1.5 Hemmung der enzymatischen Aktivität

Die Alliinase ist ein Pyridoxal-5'-phosphat abhängiges Enzym. Dies liegt kovalent gebunden in der Bindungstasche der Alliinase vor und ist direkt an der Umsetzung der Substrate beteiligt. Ein Entfernen des Cofaktors führt zu einem vollständigen Verlust der Aktivität. Aminoxyacetat ist ein stark wirksamer Inhibitor von Pyridoxal-5'-Phosphat abhängigen Enzymen. Da es sich bei der untersuchten Reaktion um eine Alliinase-ähnliche Reaktion handelt, könnte auch das vorliegende Enzym Pyridoxal-5'-Phosphat abhängig sein. Gestützt wurde diese Hypothese durch die Steigerung der Aktivität und die Stabilisierung des Enzyms durch Zugabe von PLP.

Die Untersuchung der Hemmung der Enzymaktivität erfolgte durch Zugabe von Aminoxyacetatlösung zu einem Teil des isolierten Enzyms. Eine Beschreibung dieser Methode findet sich in Kapitel 2.8.6. Die relative Aktivität wurde im Vergleich zu der unbehandelten Enzymlösung nach 10 Minuten und nach 30 Minuten bestimmt.

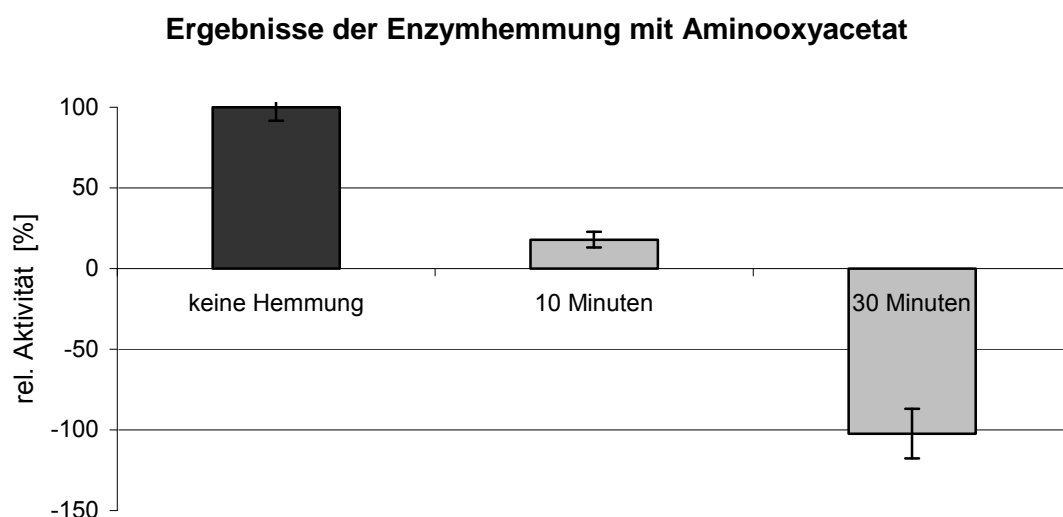


Abb.: 3.24: Hemmung der Alliinase-ähnlichen Aktivität mit Aminoxyacetat in Abhängigkeit von der Zeit



Aus Abbildung 3.24 wird ersichtlich, dass die Aktivität bereits nach 10 Minuten Inkubationszeit auf 18,0% der Anfangsaktivität gesunken ist. Nach 30 Minuten liegt die berechnete Aktivität bei -102,3%. Die Alliinase-ähnliche Enzymaktivität ist also komplett gehemmt. Es wurde kein NADH mehr umgesetzt. Welche Reaktion zu einem Anstieg der Absorption verglichen mit dem Blindwert und damit zu einem stark negativen Wert für die Aktivität führte, ist nicht ersichtlich.

### **3.4.2 Charakterisierung der Polyphenoloxidase-Aktivität**

Neben der Katalyse der Bildung des roten Farbstoffes, die vermutlich die Hauptfunktion des Enzyms darstellt, zeigte das isolierte Enzym auch eine Polyphenoloxidase-Aktivität. Polyphenole wurden hierbei von dem Enzymextrakt in dunkelbraune Oxidationsprodukte umgewandelt. Die dunkelbraunen Chinone haben ein Absorptionsmaximum von 385 nm, wo die Polyphenole selbst nur eine schwache Absorption zeigen. Die Bildung der Chinone konnte also photometrisch bei 340 nm und 405 nm verfolgt werden. Die Steigung der Absorption war direkt proportional zur Menge der gebildeten farbgebenden Komponente, des Chinons, und damit auch zur Abnahme des Polyphenols.

Als Modellsubstanzen der Polyphenoloxidase-Aktivität wurden Brenzcatechin und Dopamin verwendet (Abb. 4.13).

#### **3.4.2.1 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten**

Da der genaue Mechanismus der Umsetzung der Polyphenole durch das isolierte Enzym nicht bekannt war, konnte zur Berechnung der Aktivität auch kein molarer Extinktionskoeffizient aus der Literatur entnommen werden. Dieser konnte experimentell durch die Bestimmung der maximalen Absorption einer von dem Enzym umgesetzten Lösung bekannter Konzentration bestimmt werden. Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten erfolgte gemäß Kapitel 2.8.7.

Die Ergebnisse der Bestimmung der maximalen Absorption und die sich daraus ergebenden molaren Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 3.7 wiedergegeben. Die Bestimmung erfolgte sowohl für Brenzcatechin (Konzentration der eingesetzten Lösung 503,1 mM), als auch für Dopamin (Konzentration der eingesetzten Lösung 498,8 mM) bei beiden Wellenlängen (340 nm und 405 nm).

Die Werte des berechneten molaren Extinktionskoeffizienten wurden für die Berechnung der Aktivitäten verwendet.

	Brenzcatechin		Dopamin	
	340 nm	405 nm	340 nm	405 nm
Absorption 1	0,3300	0,2100	0,4550	0,3770
Absorption 2	0,3290	0,2230	0,4620	0,3870
Absorption 3	0,3250	0,2270	0,4660	0,4580
Absorption 4	0,3160	0,2010	0,5240	0,4400
Absorption 5	0,3250	0,2120	0,5110	0,4560
Absorption 6	0,3370	0,2260	0,5290	0,4840
Absorption 7	0,3520	0,2130	0,5550	0,5550
Absorption 8	0,3790	0,2270	0,6270	0,6020
Absorption 9	0,3490	0,2220	0,6780	0,5970
<b>molarer Extinktions- koeffizient</b>	23,51	15,16	37,47	33,96

Tab. 3.7: Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten für Brenzcatechin und Dopamin bei 340 nm und 405 nm

#### 3.4.2.2 Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte auch hier in drei Puffersystemen, Citratpuffer, Boratpuffer und Phosphatpuffer. Da auch hier die Ergebnisse nicht zufriedenstellend waren, wurde ebenfalls der Phosphatpuffer für den gesamten pH-Bereich eingesetzt, um kohärente Daten zu erhalten (eine Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 2.8.8). Die Ergebnisse der Bestimmung des pH-Optimums mit dem Phosphatpuffer sind für Brenzcatechin in Abbildung 3.25 und Dopamin in Abbildung 3.26 wiedergegeben.

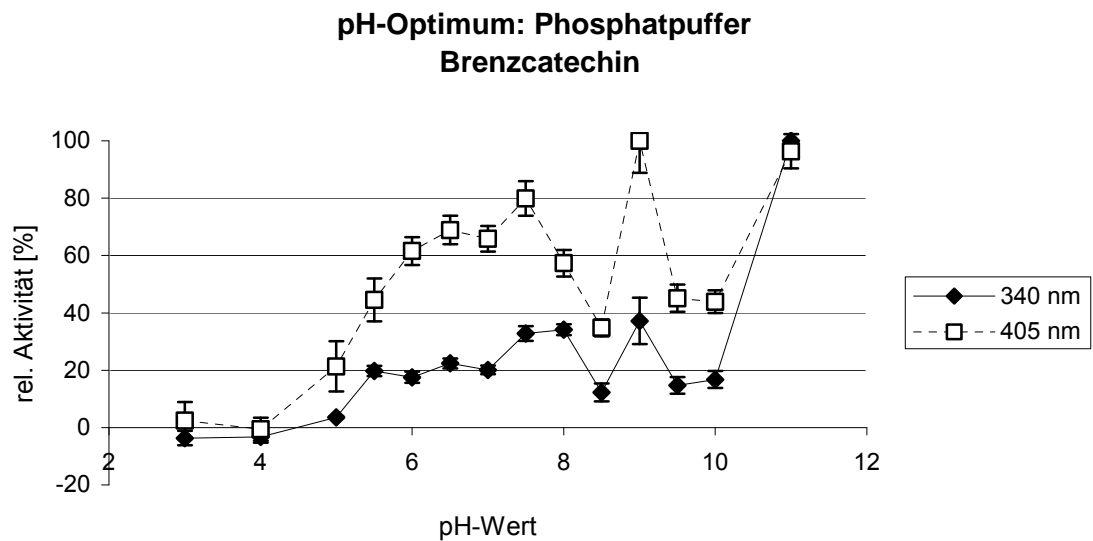


Abb. 3.25: Abhängigkeit der relativen Polyphenoloxidase-Aktivität vom pH-Wert mit dem Substrat Brenzcatechin (Phosphatpuffer)

Wie in Abbildung 3.25 zu erkennen ist, verliefen die beiden Kurven für 340 nm und 405 nm weitestgehend parallel, die relativen Aktivitäten bei 340 nm sind über weite Bereiche geringer als für 405 nm. Beide Kurven haben drei Maxima, bei pH 7,5, bzw. 8,0; 9,0 und 11,0. In der 340 nm Kurve liegt das absolute Maximum bei pH 11,0, in der 405 nm Kurve bei pH 9,0. Während die relative Aktivität bei pH 11,0 in der 405 nm Kurve bei etwa 96% liegt, beträgt sie bei 340 nm bei pH 9,0 37,2%. Für 405 nm befindet sich ein drittes Maximum bei pH 7,5 (79,9%). Unter azideren Bedingungen sinken die Werte langsam ab, mit einer kleineren Schulter bei pH 6,5. Der Verlauf bei 340 nm ist leicht verschoben. Das dritte Maximum liegt bei pH 8,0 (34,1%). Auch hier sinkt die Aktivität im sauren Bereich langsam ab und zeigt eine leichte Schulter bei pH 6,5. Erst bei pH 3,0 und 4,0 ist bei beiden Wellenlängen praktisch keine Aktivität mehr vorhanden.

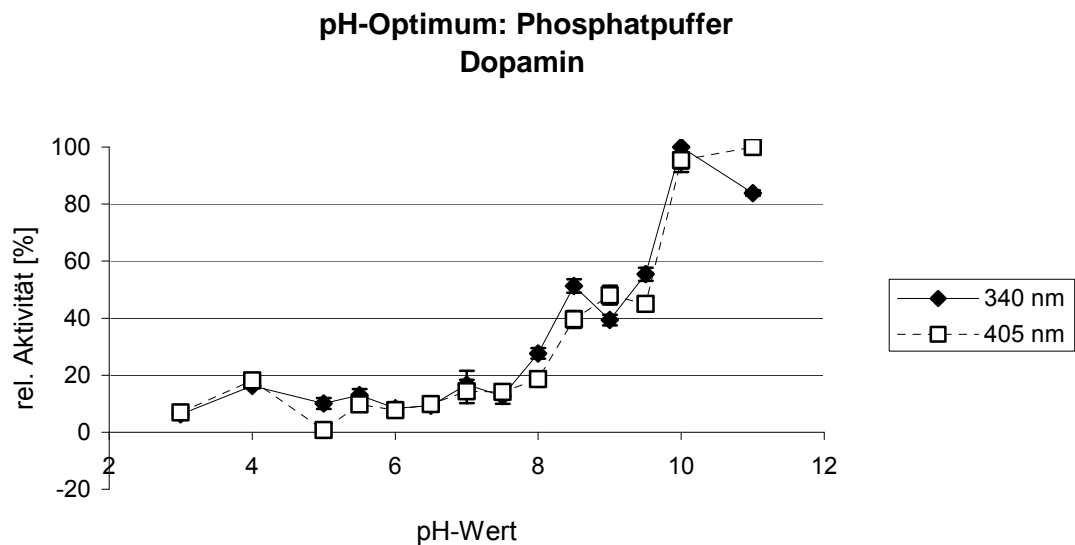


Abb. 3.26: Abhängigkeit der relativen Polyphenoloxidase-Aktivität vom pH-Wert mit dem Substrat Dopamin (Phosphatpuffer)

Der Verlauf der relativen Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert mit Dopamin als Substrat unterscheidet sich deutlich von dem Verlauf für Brenzcatechin. Die entsprechenden Kurvenverläufe sind in Abbildung 3.26 dargestellt. Diese sind für 340 nm und 405 nm leicht gegeneinander verschoben. Bis pH 7,5 sind die relativen Aktivitäten sehr gering und liegen in beiden Fällen unter 20%. Unter basischeren Bedingungen steigen beide Kurven langsam an. Der Verlauf bei 340 nm zeigt ein erstes Maximum bei pH 8,5 (51,3%) und das zweite, absolute Maximum bei pH 10,0. Bei pH 11,0 fällt der Wert wieder auf 83,9%. Für 405 nm liegt das erste Maximum bei pH 9,0 (48,1%) und das zweite absolute Maximum bei pH 11,0.

Die hohen Umsatzraten bei basischen pH-Werten sind für die Polyphenoloxidase-Aktivität vermutlich mit einer nicht-enzymatischen Reaktion zu erklären. Bei pH 11,0 können Dopamin und Brenzcatechin chemisch oxidiert werden. Die hohe Umsetzung ist damit nicht enzymatisch begründet.

#### 3.4.2.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde die relative Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich von 18 bis 40°C bestimmt. Die Durchführung erfolgte gemäß Kapitel 2.8.8. Als Substrate wurden auch hier

Brenzcatechin und Dopamin verwendet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.27 und 3.28 wiedergegeben.

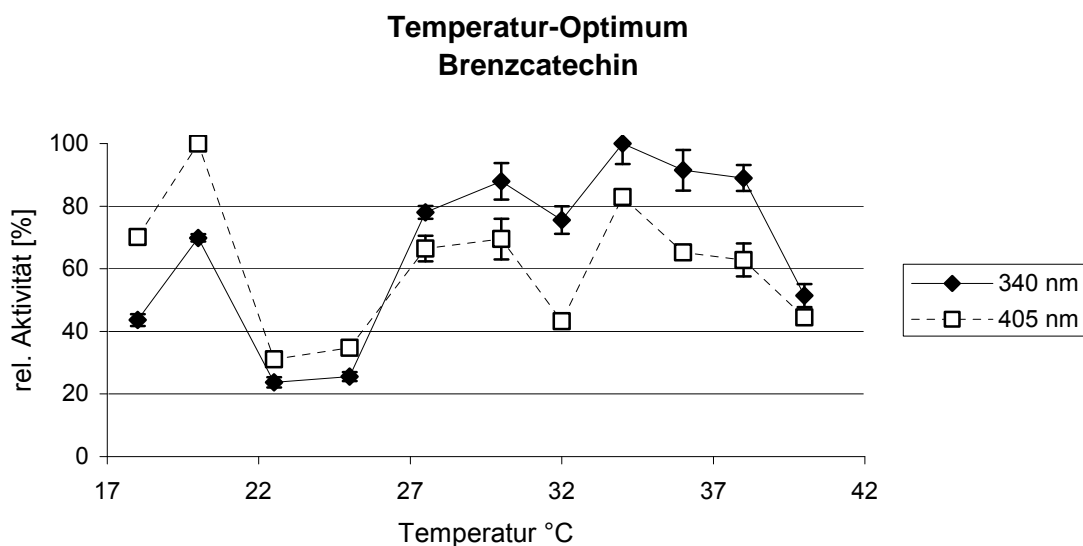


Abb. 3.27: Abhängigkeit der relativen Polyphenoloxidase-Aktivität von der Temperatur mit dem Substrat Brenzcatechin bei pH 7,5

In Abbildung 3.27 ist der Verlauf der Temperaturabhängigkeit für die Polyphenoloxidase-Aktivität mit Brenzcatechin als Substrat bei 340 nm und 405 nm wiedergegeben. Beide Kurven verlaufen parallel zueinander. Das erste Maximum liegt bei 20°C. Bei 405 nm befindet sich hier die größte Aktivität, bei 340 nm beträgt sie 69,9%. Ein zweites Maximum ist bei 30°C (88,0%, bzw. 69,5%) dicht gefolgt von einem dritten bei 34°C (100%, bzw. 82,9%). Bei höheren Temperaturen sinken die Aktivitäten bei beiden Wellenlängen langsam ab bis sie bei 40°C bei 51,4%, bzw. 44,5% liegen.

Auch hier lassen sich also drei Maxima in der Kurve nachweisen, wie schon bei der Bestimmung des pH-Optimums für Brenzcatechin.

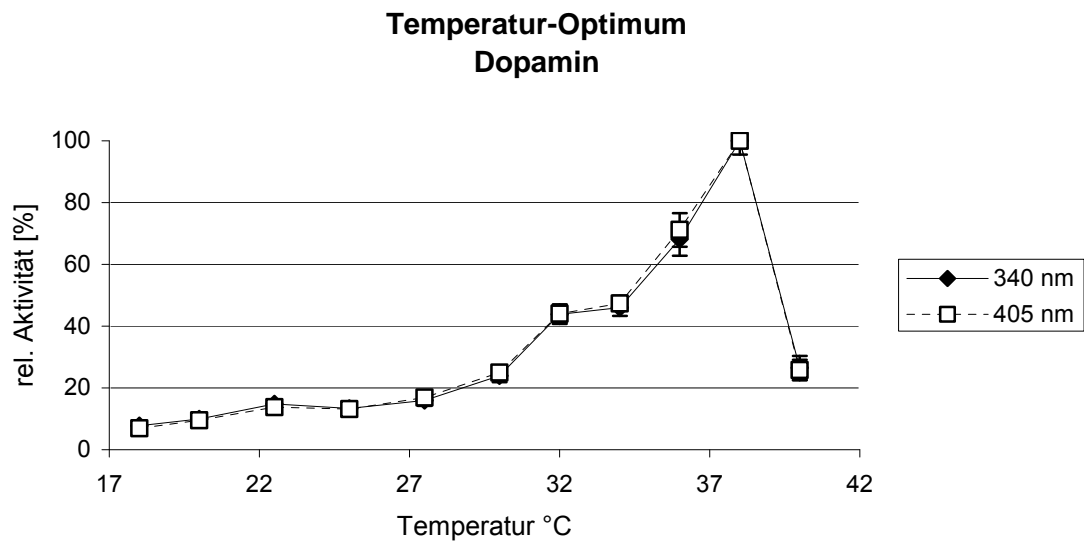


Abb. 3.28: Abhängigkeit der relativen Polyphenoloxidase-Aktivität von der Temperatur mit dem Substrat Dopamin bei pH 8,5

Auch der Verlauf des Temperatur-Optimums zeigt für Dopamin ein völlig anderes Verhalten als für Brenzcatechin (Abb. 3.28). Das Optimum befindet sich für beide Wellenlängen bei einer Temperatur von 38°C. Die Aktivität beginnt ab 30°C zuzunehmen und steigt langsam bis zum Maximum. Oberhalb von 38°C sinkt die Aktivität wieder schnell ab. Sie beträgt hier nur noch 26,5% (340 nm), bzw. 25,8% (405 nm). Das Maximum ist also sehr schmal. Auch eine Verringerung der Temperatur um nur 2°C auf 26°C führt zu einer Verminderung der Aktivität auf nur 68,2% (340 nm), bzw. 71,1% (405 nm).

#### 3.4.2.4 Michaelis-Menten-Kinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  wurde die Aktivität der Enzymumsetzung bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Als Substrate wurden auch hier Brenzcatechin und Dopamin verwendet (eine Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 2.8.8). Die Auswertung der Daten erfolgte sowohl nach Lineweaver-Burk als auch nach Hanes (Kapitel 2.8.4).

### 3.4.2.4.1 Brenzcatechin

Es wurden Brenzcatechinelösungen in einem Konzentrationsbereich von 40 mM bis 3 M eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.29 bis 3.31 zusammengefasst.

#### Lineweaver-Burk-Diagramm: Brenzcatechin

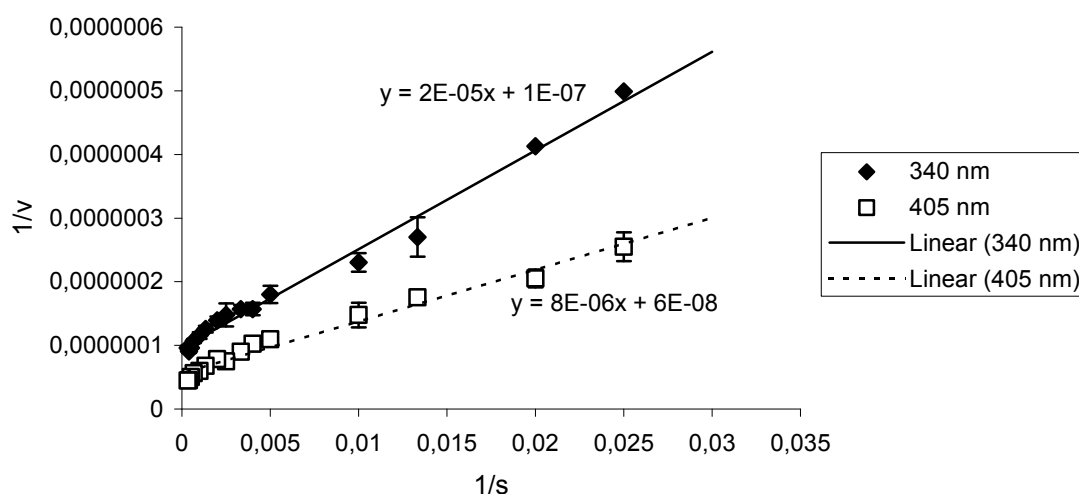


Abb. 3.29: Lineweaver-Burk Diagramm der Polyphenoloxidase-Aktivität, Substrat Brenzcatechin

#### Hanes-Diagramm: Brenzcatechin

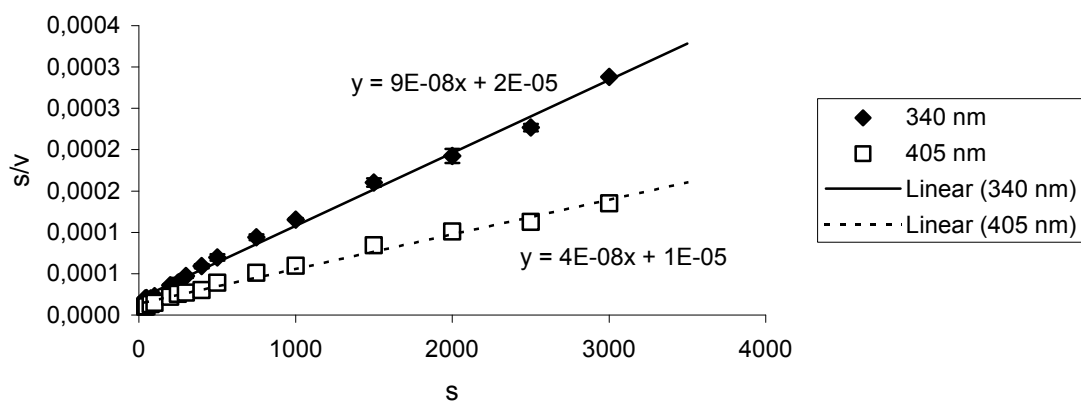


Abb. 3.30: Hanes Diagramm der Polyphenoloxidase-Aktivität, Substrat Brenzcatechin

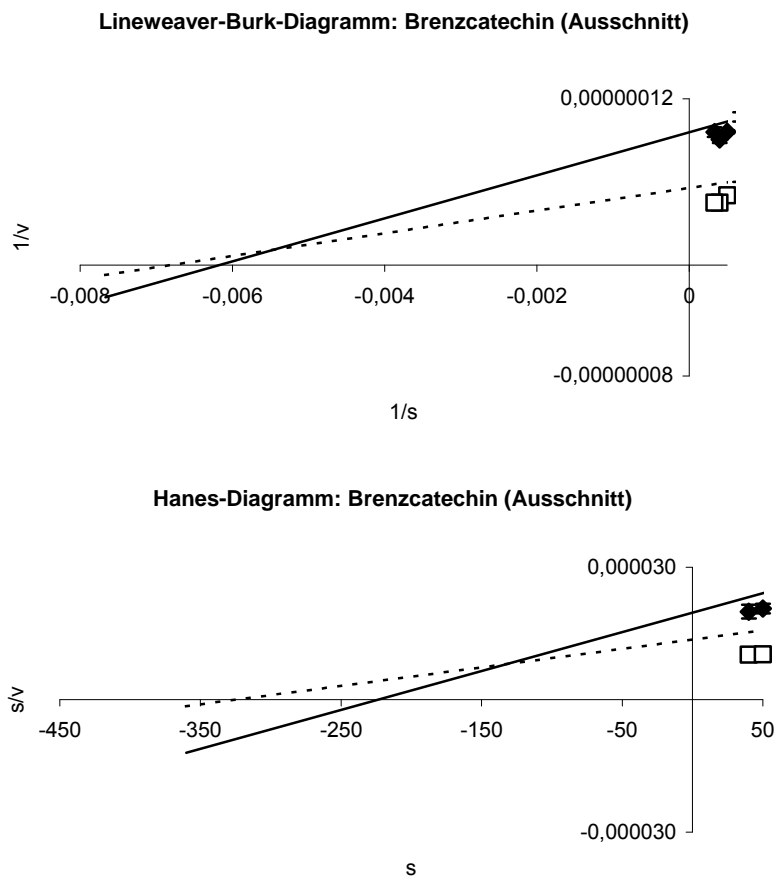


Abb. 3.31: Lineweaver-Burk und Hanes Diagramm der Polyphenoloxidase-Aktivität, Substrat Brenzcatechin (Ausschnitt)

Sowohl die Auftragungsmethode nach Lineweaver-Burk als auch die nach Hanes zeigen eine gute Korrelation (Abb. 3.29 und 3.30). Die jeweiligen Schnittpunkte mit den Achsen lassen sich aus Abbildung 3.31 ablesen. Die Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  konnten aus den Regressionsgeraden nach Kapitel 2.8.4 berechnet werden.

#### 3.4.2.4.2 Dopamin

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten Kinetik wurden Dopaminlösungen in einer Konzentration von 20 mM bis 5 M verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.32 bis 3.34 zusammengefasst.



## Lineweaver-Burk Diagramm: Dopamin

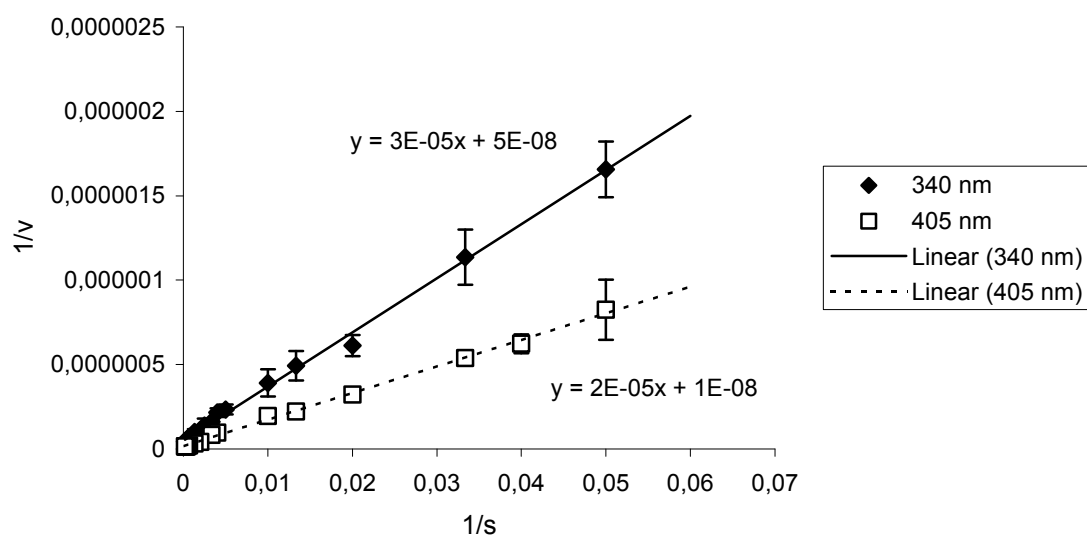


Abb. 3.32: Lineweaver-Burk Diagramm der Polyphenoloxidase-Aktivität, Substrat Dopamin

## Hanes Diagramm: Dopamin

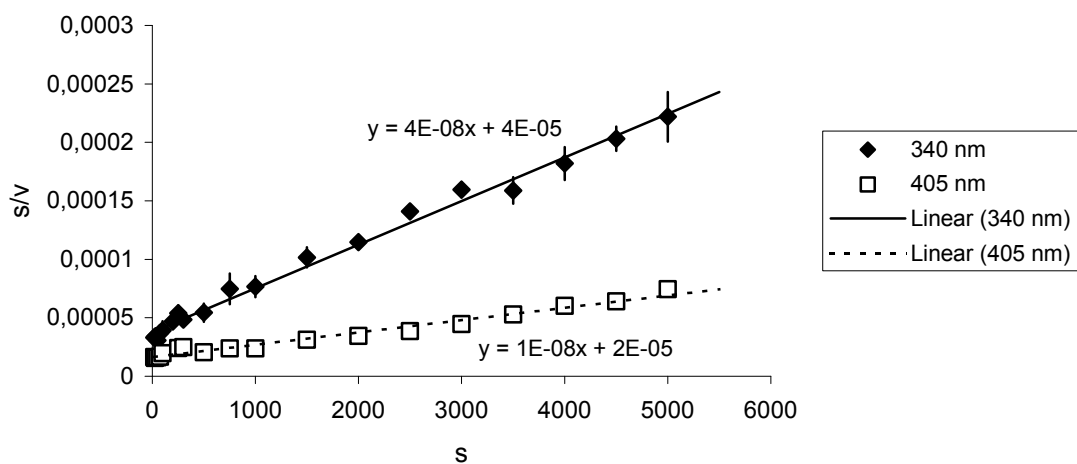


Abb. 3.33: Hanes Diagramm der Polyphenoloxidase-Aktivität, Substrat Dopamin

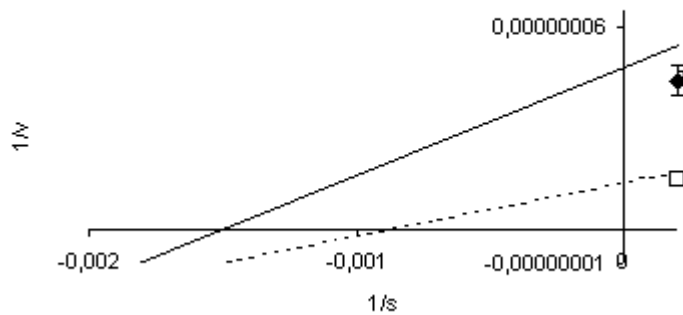
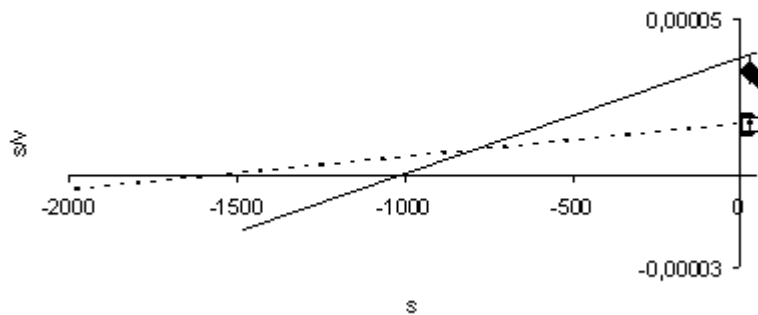
**Lineweaver-Burk Diagramm: Dopamin (Ausschnitt)****Hanes Diagramm: Dopamin (Ausschnitt)**

Abb. 3.34: Lineweaver-Burk und Hanes Diagramm der Polyphenoloxidase-Aktivität, Substrat Dopamin (Ausschnitt)

Auch hier ist eine gute Korrelation der Ergebnisse festzustellen (Abb. 3.32 und 3.33). Die Schnittpunkte der resultierenden Geraden mit den Achsen sind aus Abbildung 3.34 abzulesen. Die weitere Berechnung erfolgte aus den sich ergebenden Regressionsgeraden nach Kapitel 2.8.4.

#### 3.4.2.4.3 Zusammenfassung der $K_m$ - und $V_{max}$ -Werte

Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte, die sich nach Kapitel 2.8.4 aus den dargestellten Regressionsgeraden berechnen ließen, sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

	Brenzcatechin		Dopamin	
	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]
<b>Lineweaver-Burk</b>				
<b>340 nm</b>	0,16	$1,04 \cdot 10^7$	0,66	$2,07 \cdot 10^7$
<b>405 nm</b>	0,15	$1,80 \cdot 10^7$	1,16	$7,31 \cdot 10^7$
<b>Hanes</b>				
<b>340 nm</b>	0,22	$1,13 \cdot 10^{10}$	1,02	$2,68 \cdot 10^{10}$
<b>405 nm</b>	0,32	$2,38 \cdot 10^{10}$	1,54	$9,44 \cdot 10^{10}$

Tab. 3.8: Zusammenfassung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte nach Lineweaver-Burk und Hanes für die Polyphenoloxidase Aktivität

Die  $K_m$ -Werte für Brenzcatechin betragen 0,16 (0,15) mol/l nach Lineweaver-Burk, bzw. 0,22 (0,32) mol/l nach Hanes für Brenzcatechin und für Dopamin 0,66 (1,16) mol/l nach Lineweaver-Burk, bzw. 1,02 (1,54) mol/l nach Hanes. Die  $K_m$ -Werte sind also für beide Substanzen sehr hoch. Dasselbe gilt für die  $V_{max}$ -Werte. Für Brenzcatechin betragen sie  $1,04 \cdot 10^7$  ( $1,80 \cdot 10^7$ ) nkat/mg nach Lineweaver Burk, bzw.  $1,13 \cdot 10^1$  ( $2,38 \cdot 10^{10}$ ) nkat/mg nach Hanes; für Dopamin  $2,07 \cdot 10^7$  ( $7,31 \cdot 10^7$ ) nkat/mg nach Lineweaver-Burk, bzw.  $2,68 \cdot 10^{10}$  ( $9,44 \cdot 10^{10}$ ) nkat/mg nach Hanes.

#### 3.4.2.5 Bestimmung der Substratspezifität

Zur Bestimmung der Substratspezifität konnten verschiedene Polyphenole als Substrate eingesetzt werden. Für diese Polyphenole wurde die relative Aktivität bestimmt und miteinander verglichen (eine Beschreibung der Methode findet sich in Kapitel 2.8.5). Die Konzentration der eingesetzten Lösungen betrug 0,5 M.

### Substratspezifität Polyphenoloxidase Aktivität

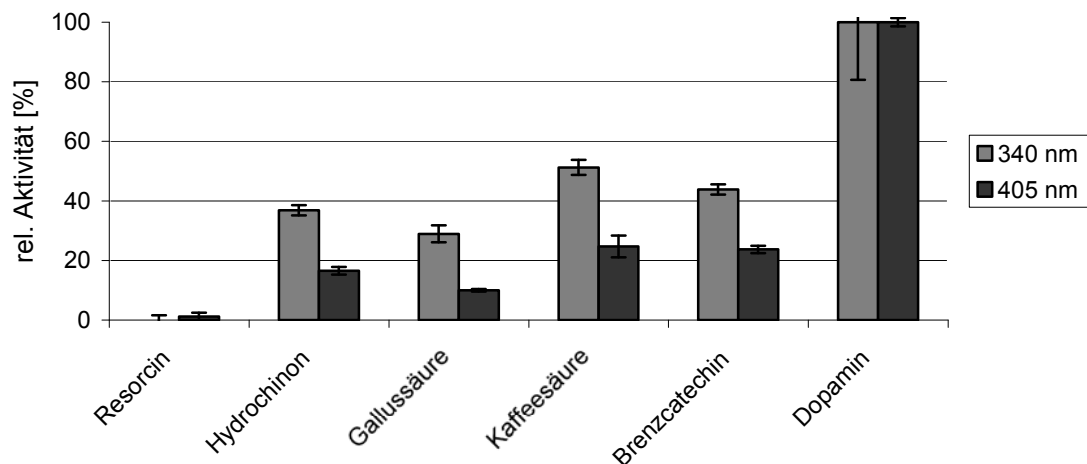


Abb. 3.35: Substratspezifität der Polyphenoloxidase-Aktivität

Wie in Abbildung 3.35 zu erkennen ist, zeigte Dopamin unter den ausgewählten Polyphenolen bei beiden Wellenlängen die höchste Aktivität. Auch die Aktivitäten von Brenzcatechin (43,9%, bzw. 23,7%) und Kaffeesäure (51,2%, bzw. 24,7%) sind sehr hoch. Daneben sind die relativen Aktivitäten von Gallussäure (29,0%, bzw. 10,0%) und Hydrochinon (36,9%, bzw. 16,6%) nur wenig niedriger. Fast gar nicht umgesetzt wird dagegen Resorcin (<0,1%, bzw. 1,1%).

#### 3.4.2.6 Hemmung der enzymatischen Aktivität

Die meisten Polyphenoloxidasen in der Natur sind Metalloproteine. Diese lassen sich durch eine Komplexierung der Metallionen im aktiven Zentrum inaktivieren. Die Inaktivierung erfolgte hier durch Zugabe einer 1 M EDTA-Lösung. Nach ca. einer Stunde Inkubationszeit wurde das EDTA aus der Lösung entfernt und die Aktivität bestimmt. Als Modellsubstanz wurde Brenzcatechin verwendet. Der Vergleich mit nicht behandelter Enzymlösung zeigte eine Abnahme der Aktivität auf 45% der Ausgangsaktivität. Dies zeigte, dass es sich tatsächlich um ein Metalloprotein handelte. Eine vollständige Inaktivierung war mit dieser Methode nicht möglich. Auch eine längere Inkubation mit der EDTA-Lösung führte nicht zu einem besseren Ergebnis.

Die Hemmung eines Metalloproteins durch Entfernung der Metallkationen ist ein reversibler Prozess. Durch Zugabe des entsprechenden Metallkations kann das Enzym

reaktiviert werden. Daher wurden zu den Reaktionsansätzen zur Bestimmung der Aktivität 10 µl einer 0,1 M Metallkationen-Lösung hinzugegeben und ca. 10 Minuten inkubiert. Danach konnte die Aktivitätssteigerung im Vergleich zu der EDTA-inaktivierten Enzymlösung ermittelt werden. Die Bestimmung der Blindwerte erfolgte durch Ersetzen der Enzymlösung im Reaktionsansatz durch Phosphatpuffer. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.36 zusammengefasst.

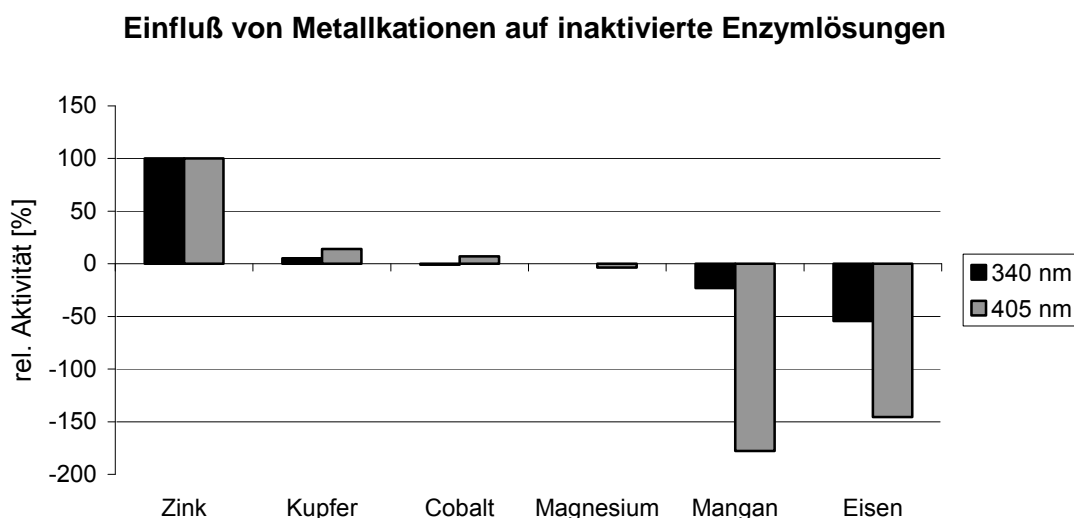


Abb. 3.36: Einfluss von Metallkationen auf EDTA-inaktivierte Enzymextrakte

Die größte Aktivitätszunahme im Vergleich zum inaktivierten Extrakt wird mit der Zugabe von Zink erzielt. Auch Kupfer führt zu einer leichten Erhöhung der Aktivität (5,1%, bzw. 14,0%). Die Mangan- und Eisenlösungen reagieren bereits ohne Zugabe von Enzym zu farbigen Lösungen. Hierdurch entstehen die hohen negativen relativen Aktivitäten. Die Zugabe von Kobalt und Magnesium zeigt keine Auswirkungen auf die relative Aktivität.

### 3.4.3 Charakterisierung der kinetischen Parameter der Bildung des Farbstoffes

Die sofort sichtbare und naheliegende Auswirkung der Aktivität des Enzyms war die Bildung des roten Farbstoffes. Hierbei handelte es sich um einen Summenparameter, da die Bildung dieses Farbstoffes aus verschiedenen Schritten bestand. Die unter Kapitel 3.4.1 beschriebene Charakterisierung der Alliinase-ähnlichen Aktivität war ein Schritt dieser Reaktionskaskade. Es sollte nun die Kinetik der Bildung des roten

Farbstoffes als Gesamtparameter bestimmt werden. Ein Vergleich mit den Daten der Alliinase-ähnlichen Aktivität ließ Rückschlüsse auf die anderen Schritte der Reaktion zu. Zur Bestimmung wurde L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid mit dem Enzym umgesetzt und die Bildung des Farbstoffes direkt photometrisch bestimmt. Da das Absorptionsmaximum des roten Farbstoffes bei 515 nm lag, wurde die Umsetzung bei 492 nm und 540 nm beobachtet (Beschreibung der Methode in Kapitel 2.8.11).

#### 3.4.3.1 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten

Da die Bildung des Farbstoffes ein Summenparameter aus mehreren, noch nicht

	492 nm	540 nm
Absorption 1	0,1420	0,098
Absorption 2	0,1470	0,116
Absorption 3	0,1370	0,115
Absorption 4	0,1490	0,123
Absorption 5	0,1400	0,109
Absorption 6	0,1510	0,116
Absorption 7	0,1330	0,101
Absorption 8	0,1570	0,107
Absorption 9	0,1420	0,098
<b>molarer Extinktionskoeffizient</b>	152334,57	116622,92

vollständig nachgewiesenen Einzelreaktionen ist, war auch hier kein molarer Extinktionskoeffizient bekannt. Dieser Parameter setzt sich aus einzelnen Werten der Einzelreaktionen zusammen und ist daher nur ein theoretischer Wert, der keiner direkten Reaktion entspricht.

Die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte gemäß Kapitel 2.8.4. Hierzu wurde die Precursorlösung mit dem Enzym umgesetzt und die maximale Absorption bestimmt. Die Konzentration der eingesetzten Precursorlösung wurde mittels HPLC nach OPA-Derivatisierung bestimmt (Beschreibung der Methode in

Tab. 3.9: Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten für die Farbstoffbildung bei 492 nm und 540 nm

Kapitel 2.4). Die daraus berechnete Konzentration betrug 33,2  $\mu\text{M}$ . Die Absorptionen und der sich daraus ergebende molare Extinktionskoeffizient sind für beide Wellenlängen in Tabelle 3.9 wiedergegeben.

Mit diesen Extinktionskoeffizienten konnte die Aktivität des Enzyms nach Kapitel 2.8.1 berechnet und bestimmt werden.

### 3.4.3.2 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden drei Puffersysteme eingesetzt: Citratpuffer, Phosphatpuffer und Boratpuffer. Aufgrund der schlechten Korrelation der drei Puffersysteme untereinander erfolgte auch hier zusätzlich die Bestimmung in Phosphatpuffer über den gesamten pH-Bereich. Diese Messungen erbrachten die besten Ergebnisse. Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH Wert ist in Abbildung 3.37 dargestellt.

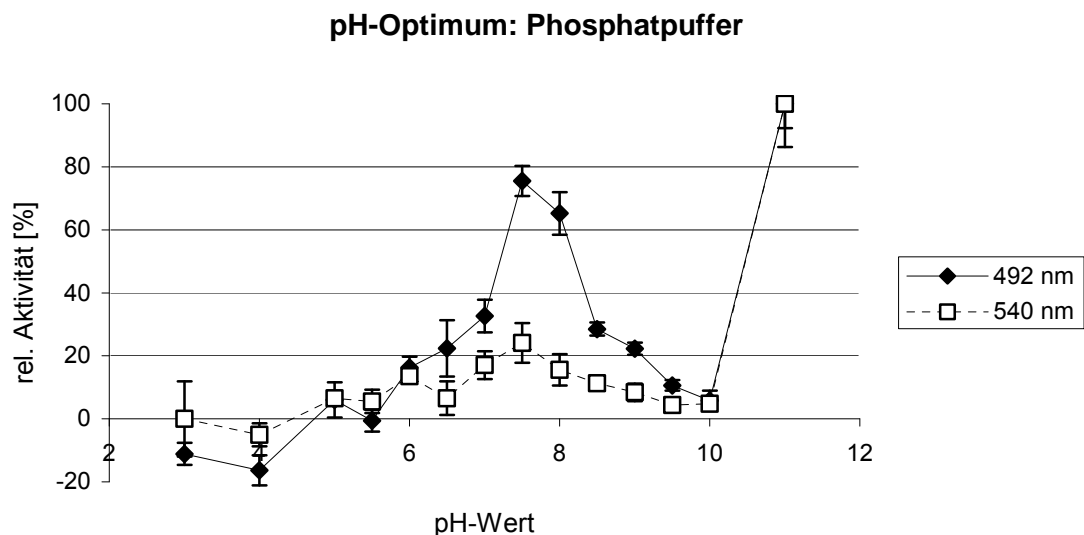


Abb. 3.37: Abhängigkeit der relativen Aktivität der Farbstoffbildung vom pH-Wert (Phosphatpuffer)

Die Kurven für beide Wellenlängen verlaufen weitestgehend parallel, wobei die relativen Intensitäten in der Kurve für 540 nm meist geringer sind. Das Optimum befindet sich bei beiden Wellenlängen bei pH 11,0. Bei pH 10,0 hingegen sind die Aktivitäten sehr gering (5,8%, bzw. 4,8%). Ein zweites Maximum befindet sich bei pH 7,5 mit einer relativen Intensität von 75,5%, bzw. 24,1%. Besonders in der 492 nm Kurve ist dieses Maximum scharf begrenzt und die Werte fallen schon bei kleineren Abweichungen im pH-Wert stark ab. So liegt die relative Aktivität bei pH 7,0 schon nur noch bei 32,6%, bei pH 8,5 bei 28,5%.

Auch hier kann die hohe Aktivität bei pH 11,0 wie bei der Bestimmung der Alliinase-ähnlichen Aktivität durch die nicht-enzymatische Reaktion des Substrates bei basischen pH-Werten erklärt werden.

#### 3.4.3.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Die Bestimmung des Temperatur-Optimums erfolgte gemäß Kapitel 2.8.12 in einem Bereich von 18 bis 40°C. Die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur sind in Abbildung 3.38 wiedergegeben.

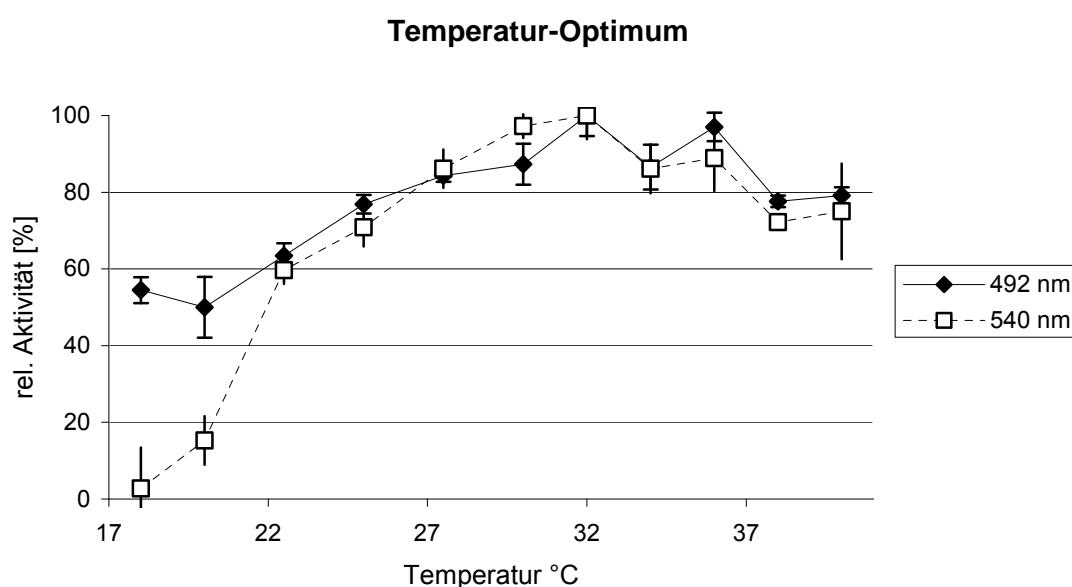


Abb. 3.38: Abhängigkeit der relativen Aktivität der Farbstoffbildung von der Temperatur bei pH 7,5

Die relativen Aktivitäten in Abhängigkeit von der Temperatur verlaufen für beide Wellenlängen parallel. Das Maximum befindet sich bei 32°C, ein zweites Maximum bei 36°C. Insgesamt sind die Aktivitätsänderungen in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich von 22,5°C bis 40°C gering, die relative Aktivität liegen hier nicht unter 60%.

#### 3.4.3.4 Michaelis-Menten-Kinetik

Die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  wurden auch für die Bildung des Farbstoffes bestimmt. Die Konzentration der eingesetzten Precursorlösungen lag in einem Konzentrationsbereich zwischen 5,2  $\mu\text{mol/l}$  und 131,0  $\mu\text{mol/l}$ . Die Auswertung erfolgte



analog Kapitel 2.8.4 nach Lineweaver-Burk und Hanes. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.39 bis 3.41 zusammengefasst.

### Lineweaver-Burk Diagramm

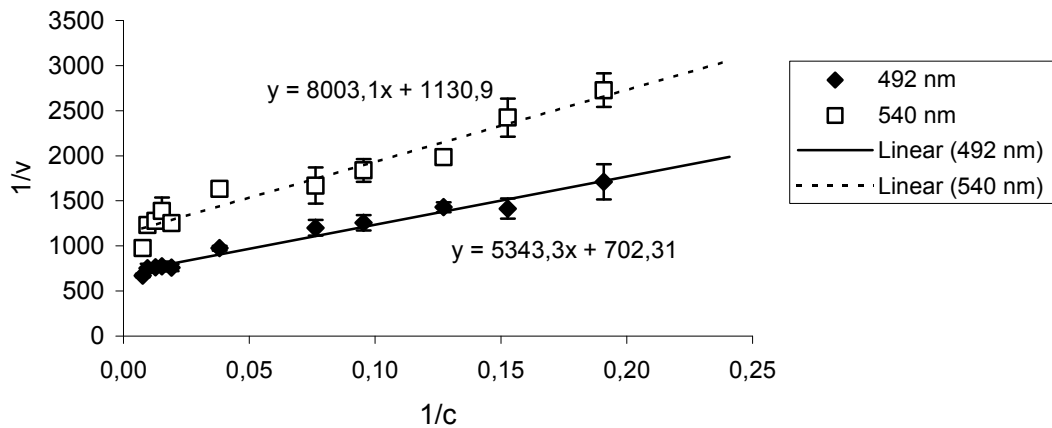


Abb.3.39: Lineweaver-Burk Diagramm der Farbstoffbildung

Die Werte korrelieren demnach gut für die Auswertung nach Lineweaver-Burk. Für die Auftragung nach Hanes ist ebenfalls eine gute Übereinstimmung zu erkennen. Die zugehörigen Regressionsgeraden können den Abbildungen 3.39 und 3.40 entnommen werden, die Schnittpunkte mit den Achsen Abbildung 3.41.

### Hanes Diagramm

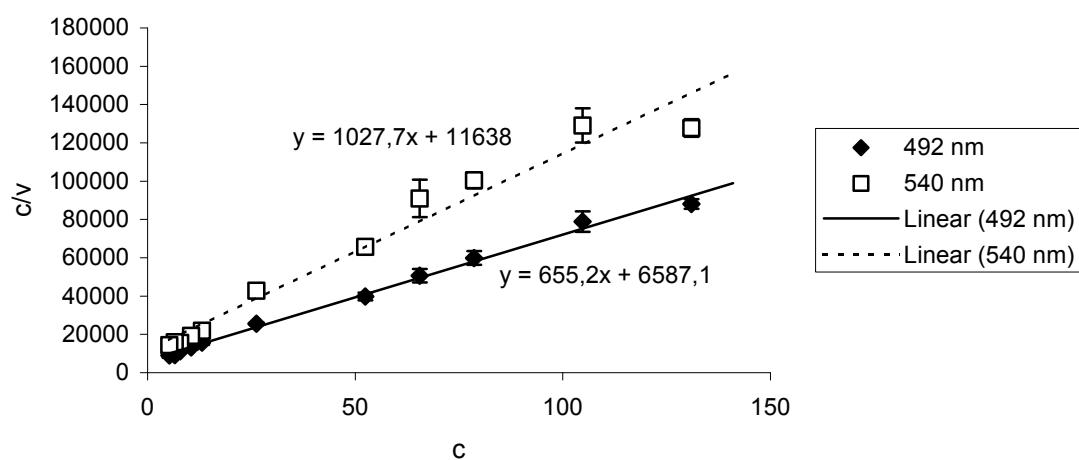


Abb. 3.40: Hanes Diagramm der Farbstoffbildung

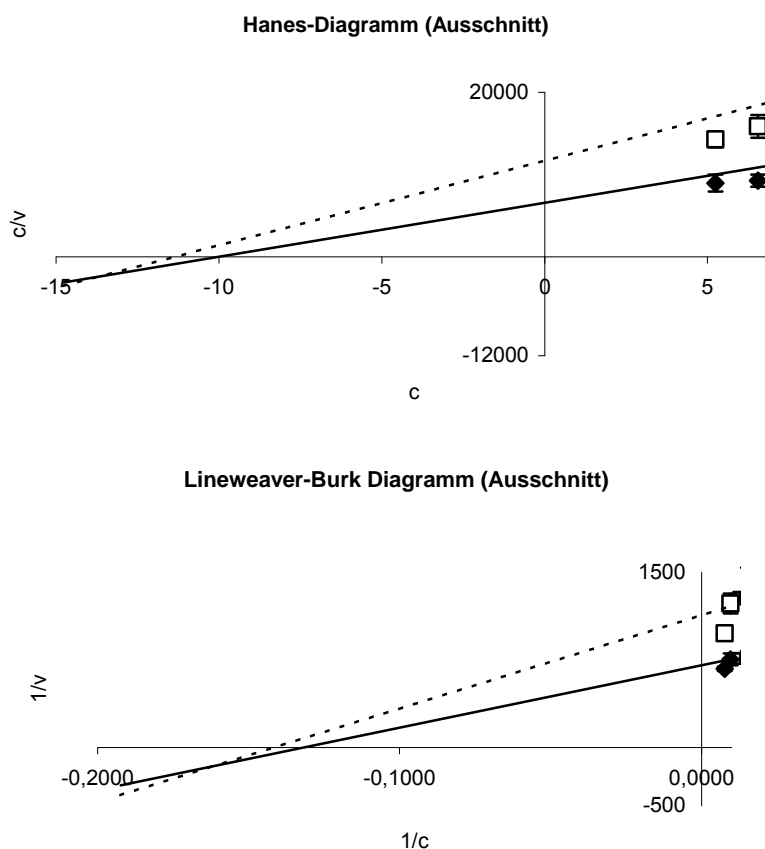


Abb. 3.41: Ausschnitte aus Lineweaver-Burk und Hanes Diagrammen der Farbstoffbildung

Die Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  berechneten sich nach Kapitel 2.8.4 aus den Regressionsgeraden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Die  $K_m$ -Werte sind mit  $7,61 \cdot 10^{-6}$  mol/l ( $7,08 \cdot 10^{-6}$  mol/l) nach Lineweaver-Burk, bzw.  $1,01 \cdot 10^{-5}$  mol/l ( $1,13 \cdot 10^{-5}$  mol/l) nach Hanes sehr gering, was für eine hohe Substratspezifität spricht. Die  $V_{max}$ -Werte sind ebenfalls sehr klein. Daher ist die Umsetzung, die Geschwindigkeit der Reaktion, sehr gering. Die Werte liegen bei  $1,42 \cdot 10^{-3}$  nkat/mg ( $8,84 \cdot 10^{-4}$  nkat/mg) nach Lineweaver-Burk, bzw.  $1,52 \cdot 10^{-3}$  nkat/mg ( $9,73 \cdot 10^{-4}$  nkat/mg) nach Hanes.

	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]
<b>Lineweaver-Burk</b>		
<b>492 nm</b>	$7,61 \cdot 10^{-6}$	$1,42 \cdot 10^{-3}$
<b>540 nm</b>	$7,08 \cdot 10^{-6}$	$8,84 \cdot 10^{-4}$
<b>Hanes</b>		
<b>492 nm</b>	$1,01 \cdot 10^{-5}$	$1,52 \cdot 10^{-3}$
<b>540 nm</b>	$1,13 \cdot 10^{-5}$	$9,73 \cdot 10^{-4}$

Tab. 3.10: Zusammenfassung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte nach Lineweaver-Burk und Hanes für die Bildung des roten Farbstoffes

### **3.5 Farbstoff und weitere Reaktionsprodukte**

Bei der Reaktion des Pyrrolylcysteinsulfoxides unter Katalyse des Alliinase-ähnlichen Enzyms sollten in Anlehnung an die Reaktion der Alliinase mit Cysteinsulfoxiden zunächst Thiosulfinate entstehen. Da diese instabil sind, reagieren sie schnell weiter. Das Produkt ist in diesem Fall das farbige Dithiodipyrrol [Jedelská 2007]. Neben diesem Primärprodukt sind in Anlehnung an die Reaktionen der anderen Cysteinsulfoxide auch andere Produkte möglich. Zusätzlich ist der Farbstoff relativ instabil und unterliegt damit ebenfalls Folgereaktionen wie Polymerisierung. Der Farbstoff und weitere Reaktionsprodukte aus Arten des Subgenus *Melanocrommyum* sollten untersucht werden, um weitere Anhaltspunkte über die Reaktionen zu erhalten.

#### **3.5.1 Identifizierung des Farbstoffes**

Der Farbstoff sollte gemäß dem Protokoll von Jedelská [2007] für weitere *Melanocrommyum*-Arten aufgereinigt werden. Die Struktur des Farbstoffes wurde für *A. giganteum* als Dithiodipyrrol identifiziert. Die Extraktion erfolgte zunächst in Dichlormethan und Ethylacetat. Die vereinigten Extrakte wurden mittels Flash Chromatographie an einer Kieselgelsäule mit einem Lösungsmittelgradienten aufgetrennt (Beschreibung der Methode in Kapitel 2.9.2). Die Fraktionen wurden gesammelt und mittels HPLC und HPLC-MS näher untersucht. Die Trennung ergab mehrere gefärbte Fraktionen, deren Farben von gelb oder bräunlich über orange bis hin zu verschiedenen Rottönen variierten. In den meisten dieser Fraktionen konnte der rote Farbstoff nachgewiesen werden, in allen befanden sich zusätzlich signifikante Mengen anderer Substanzen. Eine Isolierung des Farbstoffes war also nicht möglich. Im folgenden wurde die Aufreinigungsmethode variiert. Dies führte ebenfalls nicht zu einer vollständigen Isolierung.

So erfolgte zunächst eine fraktionierte Extraktion der Zwiebeln. Hierzu wurden Lösungsmittel steigender Polarität verwendet (Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol, Wasser). Die weitere Auftrennung der drei ersten Fraktionen konnte über eine Flashchromatographie an einer Kieselgelsäule mit einem Lösungsmittelgradienten erreicht werden. Die entstehenden Fraktionen wurden gesammelt und mittels HPLC und HPLC-MS genauer untersucht. Auch hier war keine Fraktion nachzuweisen die nur den Farbstoff enthielt. Des weiteren konnten verschiedene andere Methoden getestet werden. Unter anderem konnte bei einer präparativen HPLC an einer reversed phase

Säule der Farbstoff bei 515 nm detektiert werden. Mit dieser Methode, die auch zur Aufreinigung des Precursors diente, konnte der Farbstoff in den Fraktionen nachgewiesen werden, was allerdings ebenfalls nicht zum reinen Farbstoff führte. Zusätzlich wurde eine weitere Aufreinigung einer Fraktion aus der Flash-Chromatographie mit Hilfe einer Ionenaustauschchromatographie versucht. Unter den Bedingungen des Anionenaustauschers schien der Farbstoff nicht stabil zu sein. Der Farbstoff konnte nicht eluiert werden.

#### *3.5.1.1 Bestimmung des Farbstoffes mittels MS und HPLC-MS*

Für die Bestimmung des Farbstoffes in den aufgereinigten Fraktionen wurde Massenspektrometrie mit direkter Injektion ebenso wie HPLC-MS Messungen verwendet. Der Farbstoff erwies sich als besser negativ ionisierbar. Die Retentionszeit in der HPLC-MS (Methode siehe Kapitel 2.9.4) betrug 46 Minuten. Die Substanz war als breiter Peak gut im UV-Detektor bei 515 nm nachweisbar. Die Identifizierung erfolgte über die Retentionszeit und das Fragmentierungsmuster, das in Abbildung 3.42 wiedergegeben ist. Besonders typisch ist hier das Fragment  $m/z$  97, das dem schwefelsubstituierten Pyrrolring entspricht (Abb. 3.43).

Des weiteren konnten in den Extrakten eine Vielzahl anderer Substanzen detektiert werden.

## Ergebnisse

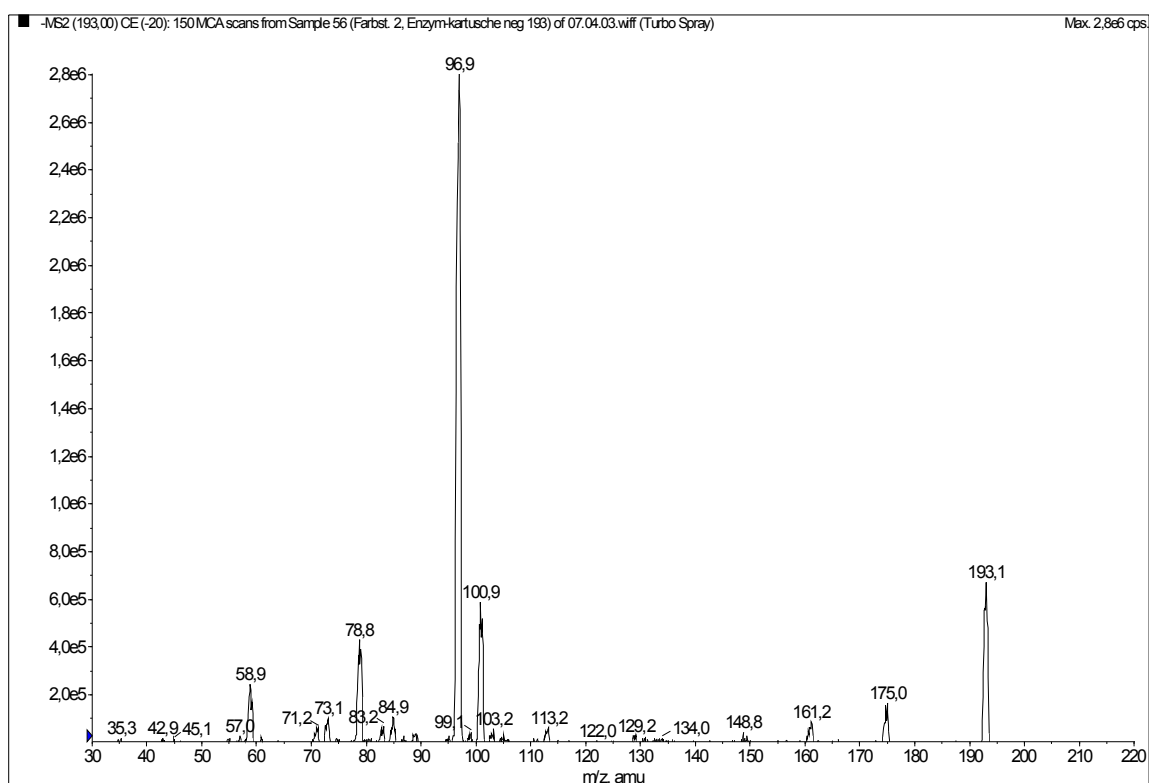


Abb. 3.42: MS/MS Spektrum von m/z 193 (Dithiodipyrrol), negative Ionisierung

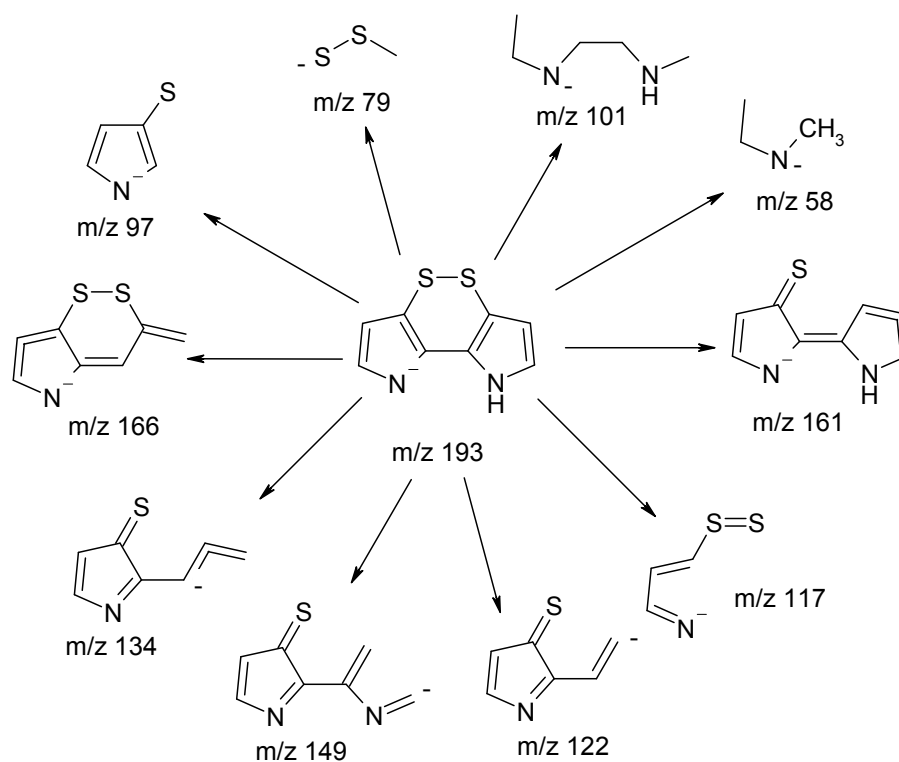


Abb. 3.43: Interpretation der Massenfragmente von m/z 193 (Dithiodipyrrol), neg. Ionisierung

### 3.5.2 Substanzen aus Farbstoffextrakten

In den Farbstoffextrakten, wie auch in den Reaktionsprodukten der ungefärbten, enzyminaktivierten Extrakte versetzt mit Enzymlösung, waren eine Vielzahl von Substanzen nachweisbar. Eine Isolierung dieser Substanzen war aufgrund der großen Anzahl und der vermutlichen Instabilität der meisten Verbindungen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Dennoch wurden einige der Substanzen mittel HPLC-MS und MS/MS Experimenten näher untersucht. Im folgenden soll näher auf die Substanzen  $m/z$  256, 257, 387, 225, 227, 450 und 290 sowie auf einige Polymerisierungsprodukte eingegangen werden.

Bei den HPLC-MS Messungen der Farbstoffextrakte fiel auf, dass eine Substanz ( $m/z$  256) immer den roten Farbstoff ( $m/z$  193) begleitete. Eine weitere Substanz ( $m/z$  257) konnte in vielen Fraktionen nachgewiesen werden. Diese wurde in MS/MS-Experimenten fragmentiert, um aus dem Fragmentierungsmuster Rückschlüsse auf die Struktur zu ziehen (Abb. 3.44 und 3.45).

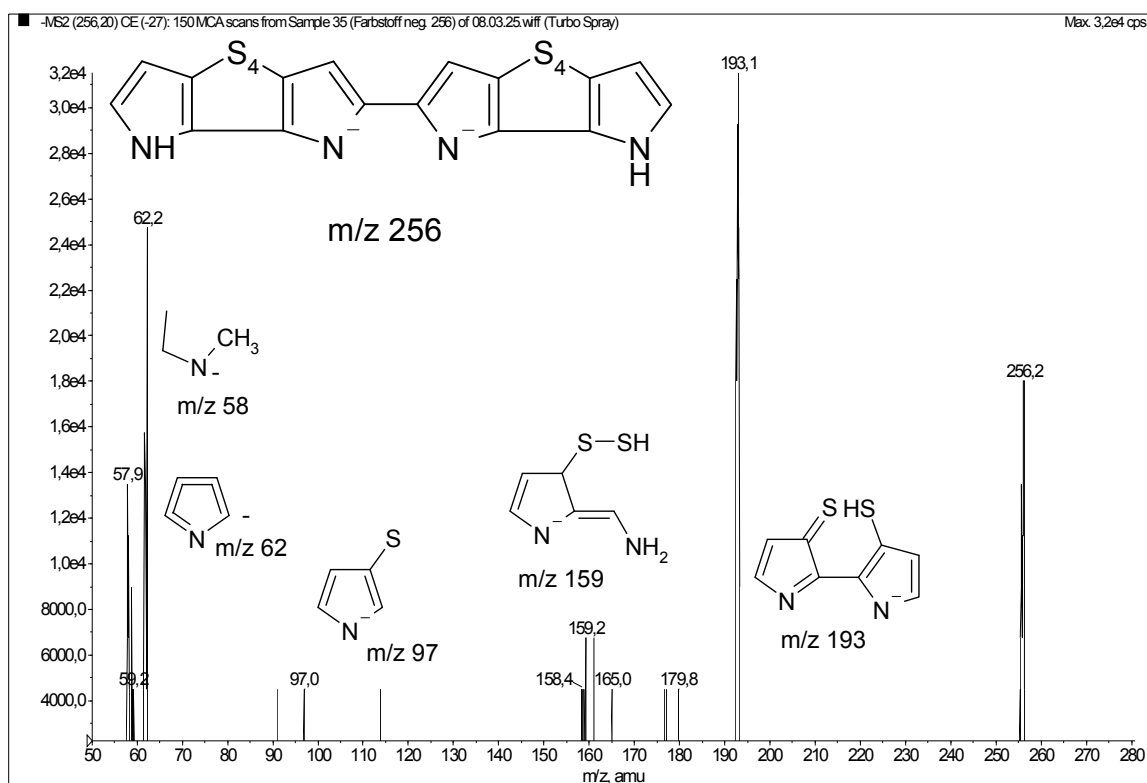


Abb. 3.44: MS/MS Spektrum von  $m/z$  256, vermutete Struktur und sich daraus ergebende Zuordnung der Fragmente

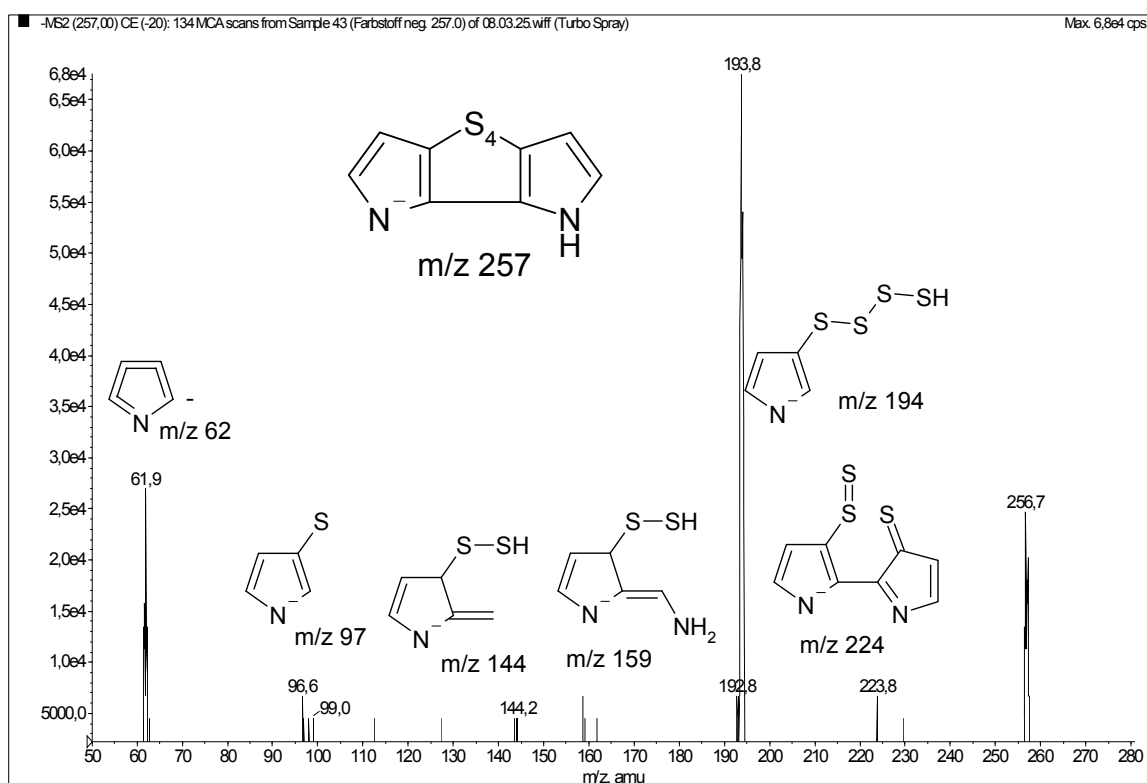


Abb. 3.45: MS/MS Spektrum von  $m/z$  257, vermutete Struktur und sich daraus ergebende Zuordnung der Fragmente

Aus den Fragmenten konnte also auf ein Tetrathiodipyrrol und dessen Dimer geschlossen werden.

Des weiteren waren andere Polysulfide nachweisbar. So konnten in Farbstoffextrakten die Massen des Penta-, Hexa-, Hepta-, und Oktathiopyrrol detektiert werden. Interessanterweise waren von allen diesen Polythiosulfonaten auch Formen nachweisbar, deren Pyrrolreste nicht zwischen C3 und C3' verbunden sind. Als Beispiel hierfür ist in Abbildung 3.46 das MS/MS Spektrum des Oktathiopyrrol wiedergegeben. Zusätzlich konnten von allen Substanzen außer dem Hexathiosulfonat auch die Oxide nachgewiesen werden.



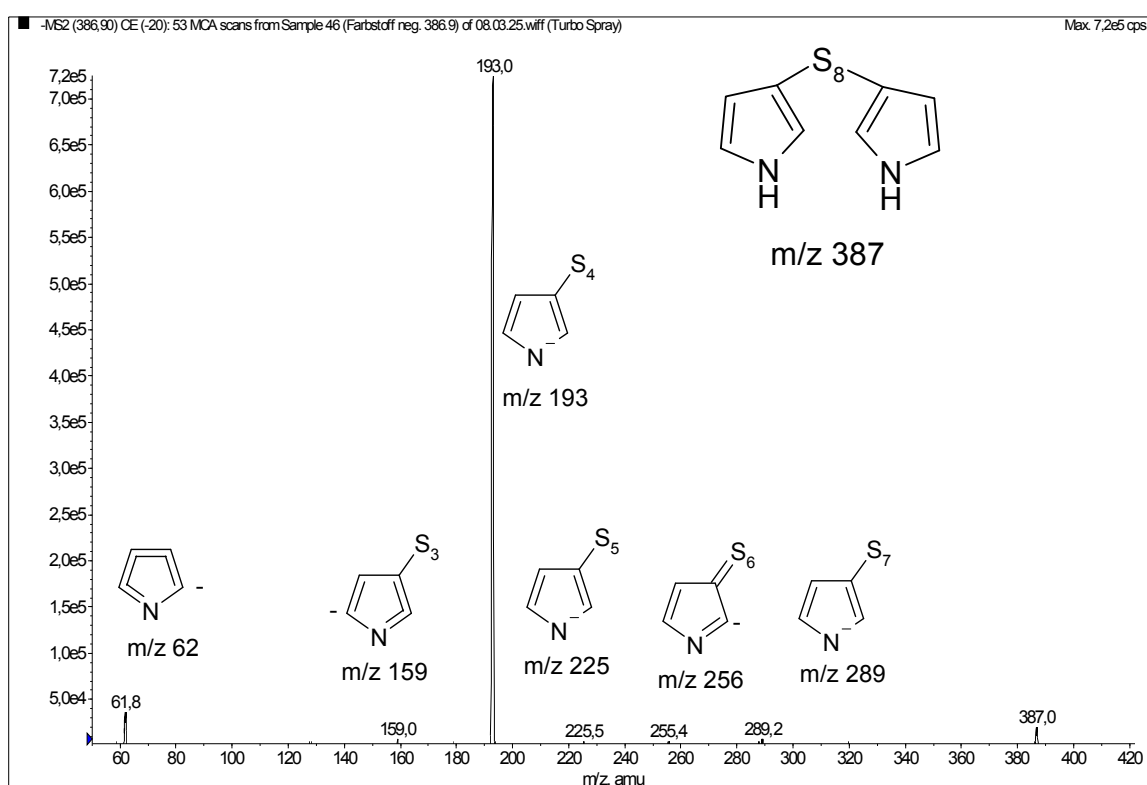


Abb. 3.46: MS/MS Spektrum von m/z 387, vermutete Struktur und sich daraus ergebende Zuordnung der Fragmente

MS/MS Experimente zeigten, dass es sich bei den formal als Polythiopyrrol berechneten Strukturen auch um die entsprechenden Polythiodipyrroldioxide handeln könnte. Als Beispiele sind die MS/MS Spektren von m/z 225 und m/z 227 wiedergegeben. Hierbei könnte es sich um das Trithiodipyrrol und dessen nicht zwischen C3 und C3' verbundene Form handeln. Die MS/MS Spektren sprachen aber eher für das Dithiodipyrrol-di-S-Oxid (Abb. 3.47 und 3.48).

## Ergebnisse

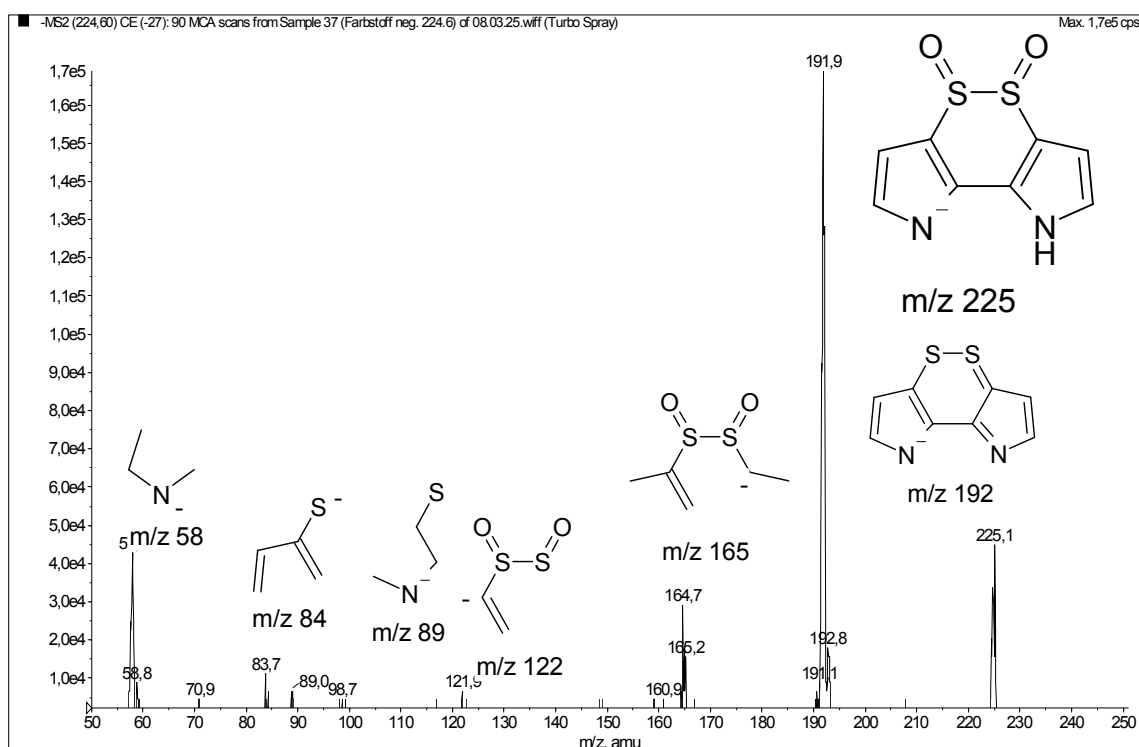


Abb. 3.47: MS/MS Spektrum von  $m/z$  225, vermutete Struktur und sich daraus ergebende Zuordnung der Fragmente

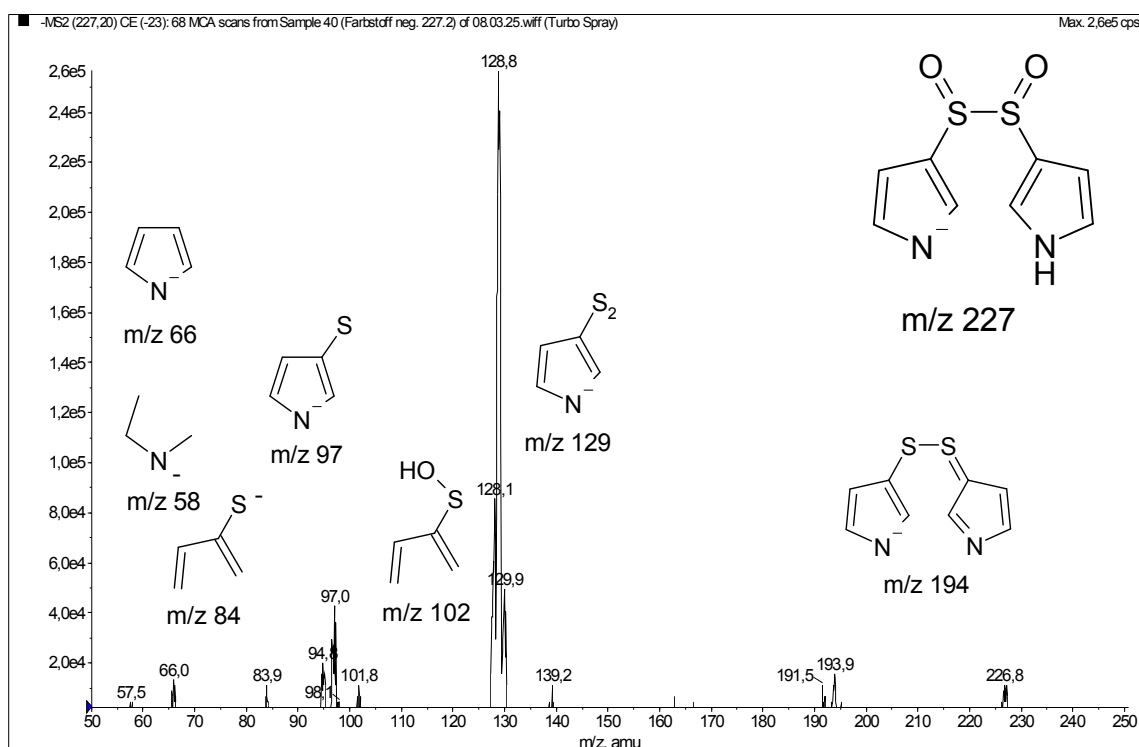
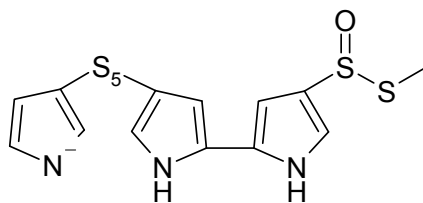


Abb. 3.48: MS/MS Spektrum von  $m/z$  227, vermutete Struktur und sich daraus ergebende Zuordnung der Fragmente

Des weiteren konnte eine Substanz mit  $m/z$  450 nachgewiesen werden. Diese könnte der Struktur in Abbildung 3.49 entsprechen. Die Fragmentierung dieser Substanz war nicht möglich.



$m/z$  450

Abb. 3.49: Mögliche Struktur von  $m/z$  450

Das Fragmentierungsmuster von  $m/z$  290 spricht für eine eher ungewöhnliche Struktur. Das MS/MS Spektrum und die zugehörigen vermuteten Fragmentstrukturen sind in Abbildung 3.50 wiedergegeben.

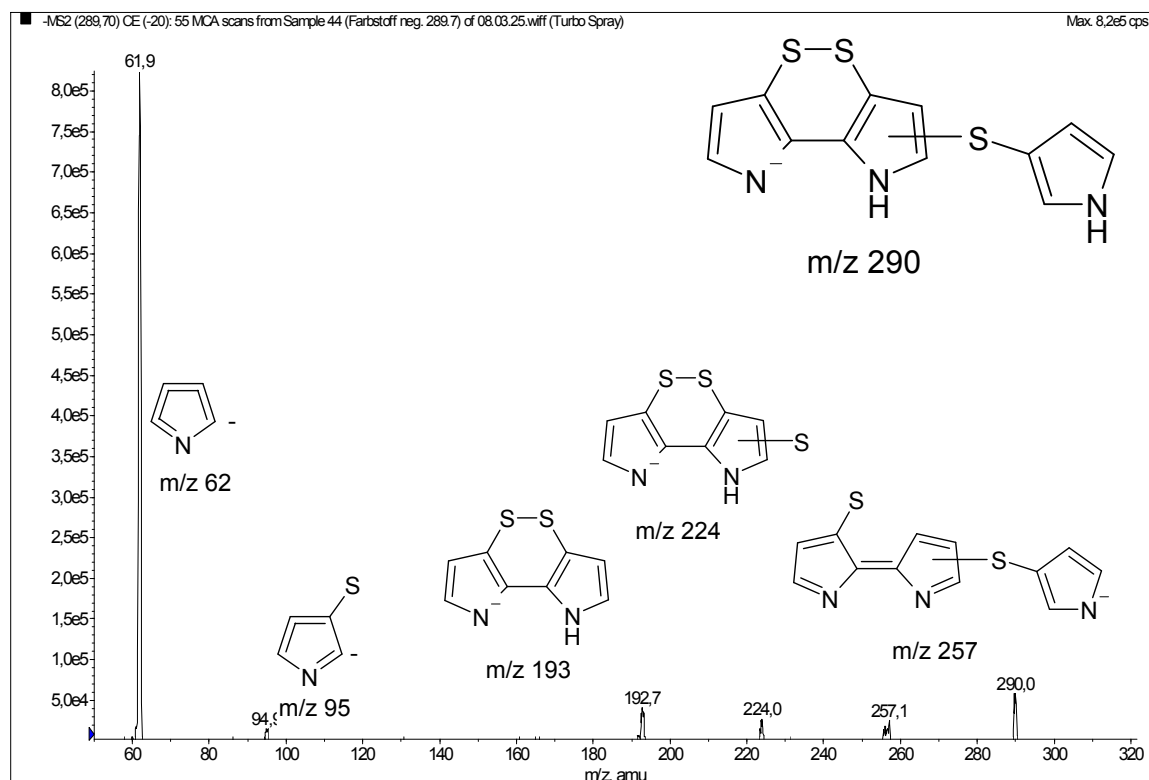


Abb. 3.50: MS/MS Spektrum von  $m/z$  290, vermutete Struktur und sich daraus ergebende Zuordnung der Fragmente

Zusätzlich konnten in den Extrakten die  $m/z$  der Polymeren des Farbstoffes in Spuren nachgewiesen werden. So konnten das Dimer des Farbstoffes sowie dessen Oxide detektiert werden (Abb. 3.51).

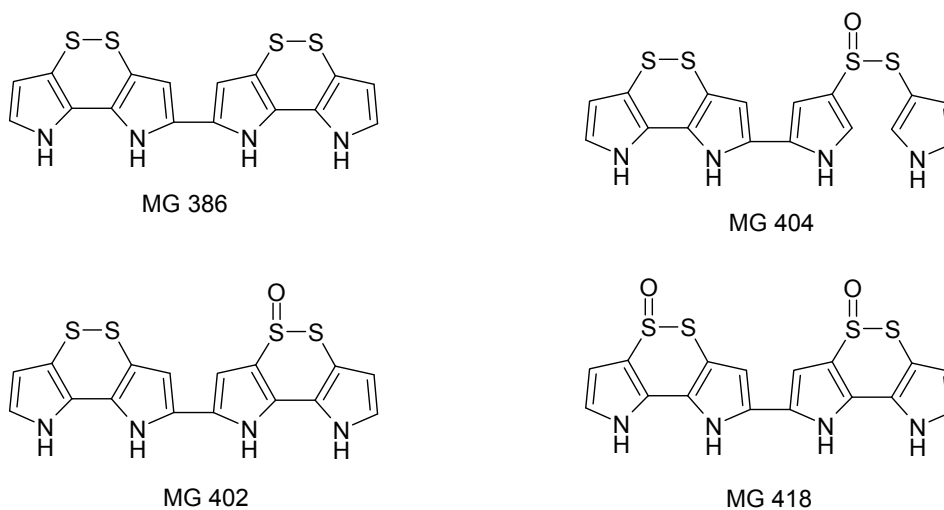


Abb. 3.51: Dimere des Farbstoffes

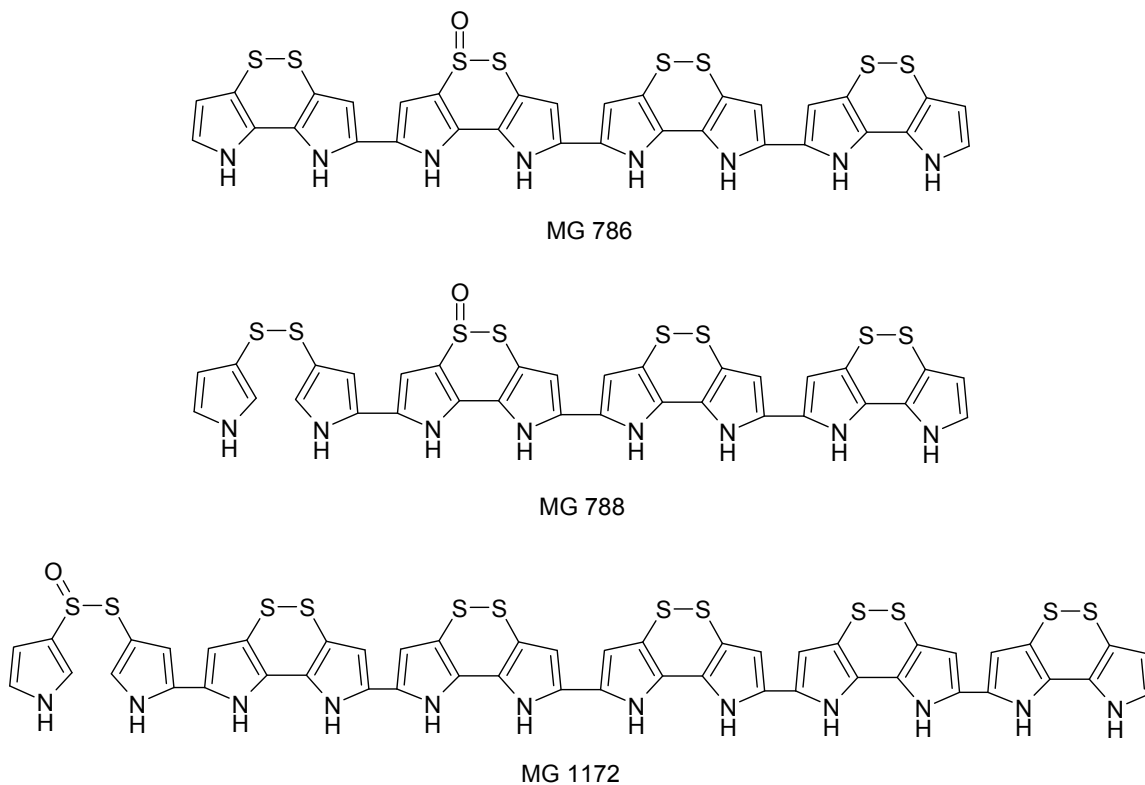


Abb. 3.52: Offenkettige Polymere des Farbstoffes

Auch höhere Polymere waren nachweisbar, sowohl in der Kettenform als auch in Ringform (Abb. 3.52 und 3.53). So konnte die oxidierte Form des Tetramers in beiden Formen gefunden werden. Zusätzlich war von der Ringstruktur auch das nichtoxidierte Produkt zu detektieren. Das Pentamer lag im Ring als Dioxid, das Hexamer in der offenkettigen Form als Monooxid vor.

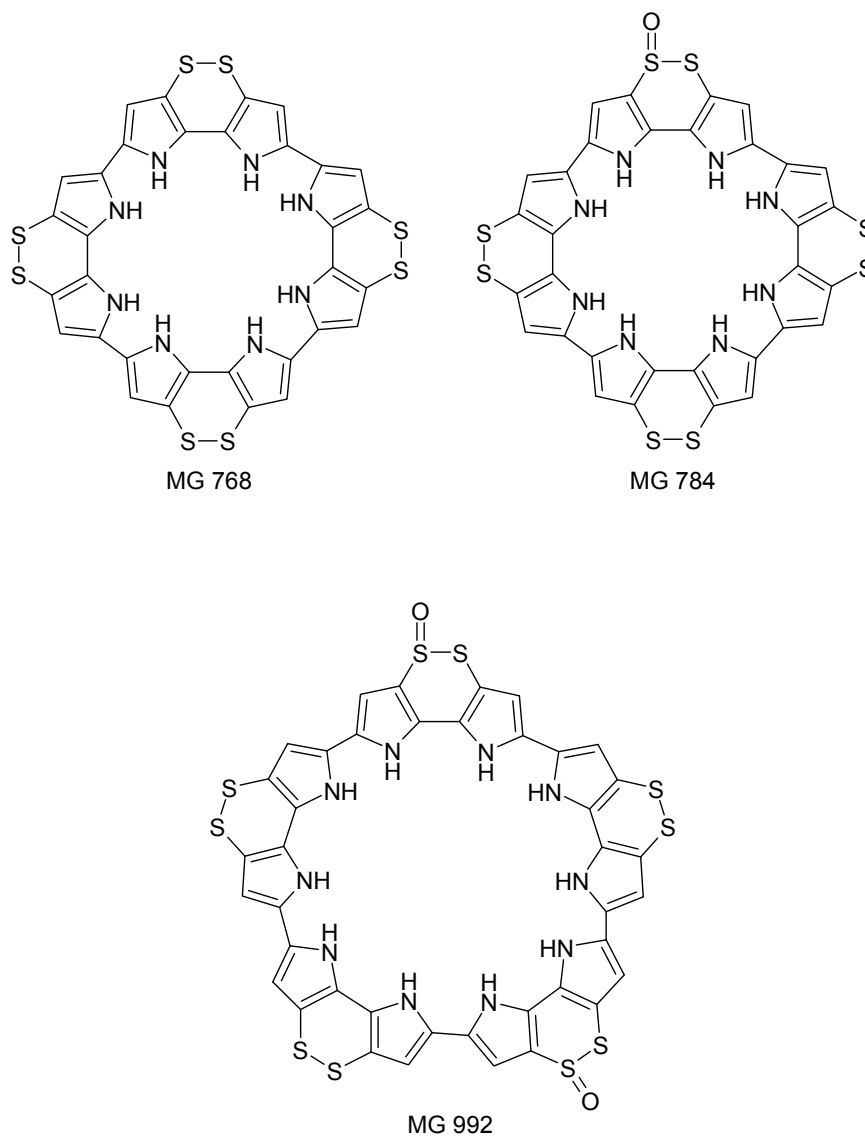


Abb. 3.53: Ringförmige Polymere des Farbstoffes

### **3.6. Untersuchung der Extrakte aus *A. stipitatum***

*Allium stipitatum* gehört zu den Arten des Subgenus *Melanocrommyum*, die bei der Verletzung der Zellsubstanz keinen roten Farbstoff produzieren. In OPA-Derivaten methanolisch-wässriger Extrakte konnte kein Pyrrolylcysteinsulfoxid nachgewiesen werden. Um dies zu bestätigen, sollten daher Extrakte dieser Art näher untersucht werden.

#### **3.6.1 Cysteinsulfoxide in *A. stipitatum***

Die Extraktion der Zwiebeln erfolgte analog der Aufreinigung des Farbstoff Precursors nach Kapitel 2.10.1. Im wässrigen Extrakt konnte das S-Pyrrolylcysteinsulfoxid nicht nachgewiesen werden. Dagegen war im methanolischen Extrakt eine Substanz enthalten, deren Fragmentierungsmuster in massenspektrometrischen Messungen auf ein unbekanntes Cysteinsulfoxid hindeutete. Die untersuchte Substanz hatte ein Molekulargewicht von 214 g/mol.

Zur weiteren Aufreinigung und Isolierung der Substanz wurde eine präparative HPLC nach der Methode zur Aufreinigung des Pyrrol-Derivates (vgl. Kapitel 2.5.2) durchgeführt. Leider war eine vollständige Aufreinigung dieser Substanz mit der vorliegenden Methode nicht möglich.

Aufgrund der Verunreinigungen waren keine aussagekräftigen NMR-Messungen möglich, daher wurden die vorliegenden Fraktionen im folgenden massenspektrometrisch weiter untersucht. Die gesuchte Substanz hatte mit der verwendeten HPLC-Methode (Beschreibung der Methode in Kapitel 2.12.2 und 2.4) eine Retentionszeit von 10 Minuten. Sie war positiv wie negativ ionisierbar, mit  $m/z$  215, bzw. 213. Die Fragmente der MS/MS-Messungen (Abb. 3.55) ließen auf ein weiteres, bisher nicht bekanntes Cysteinsulfoxid schließen, ein Pyridinylcysteinsulfoxid (Abb. 3.54 und 3.56). Zur Bestätigung der vermuteten Struktur muss die Substanz in Zukunft vollständig isoliert und NMR- und IR-Experimente durchgeführt werden. Auch das Substitutionsmuster des Pyridinringes kann mit Hilfe der NMR Spektroskopie ermittelt werden.

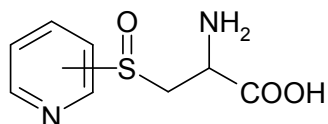


Abb. 3.54: Vermutete Struktur der Substanz aus *A. stipitatum*

Als weiteres Cysteinsulfoxid konnte außerdem in den Rohextrakten Methiin nachgewiesen werden. Mit der angegebenen HPLC-Methode hatte dieses eine Retentionszeit von 6 Minuten mit  $m/z$  152, bzw. 150 in positiver oder negativer Ionisation. Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich der Retentionszeit und des Fragmentierungsmusters mit synthetisch hergestelltem Methiin.

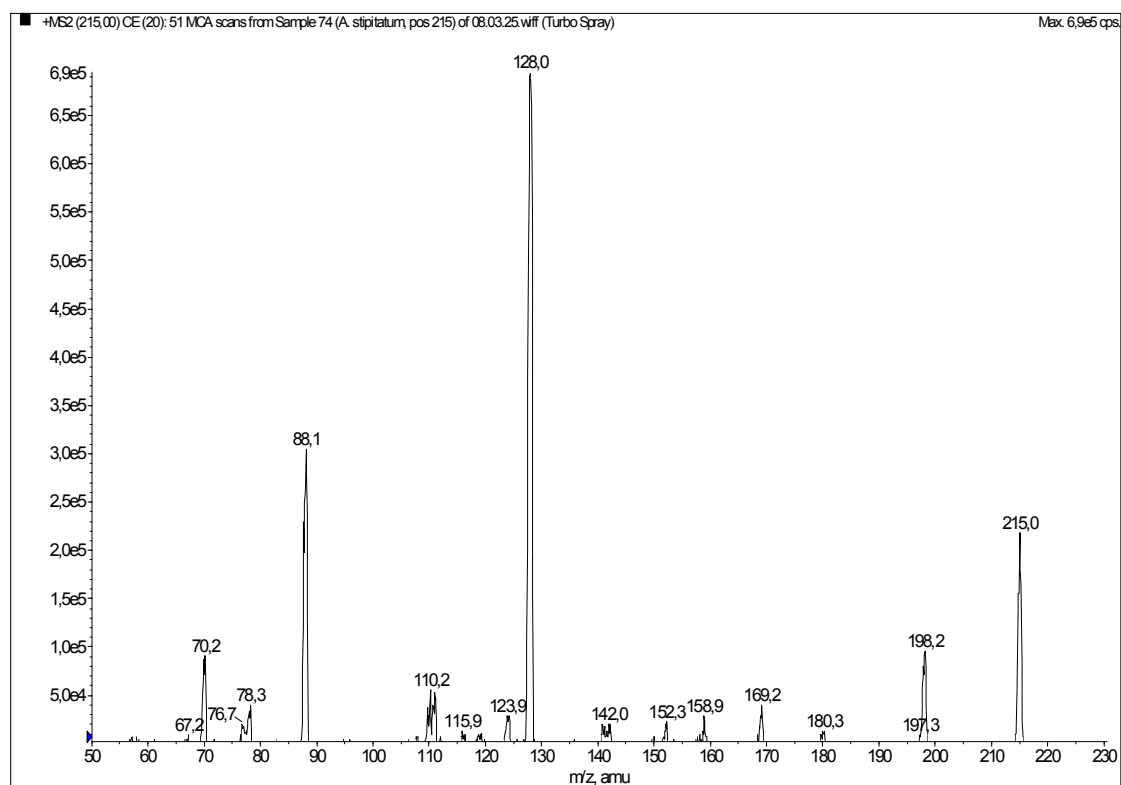


Abb. 3.55: MS/MS Spektren der unbekannten Substanz aus *A. stipitatum* in positiver Ionisation

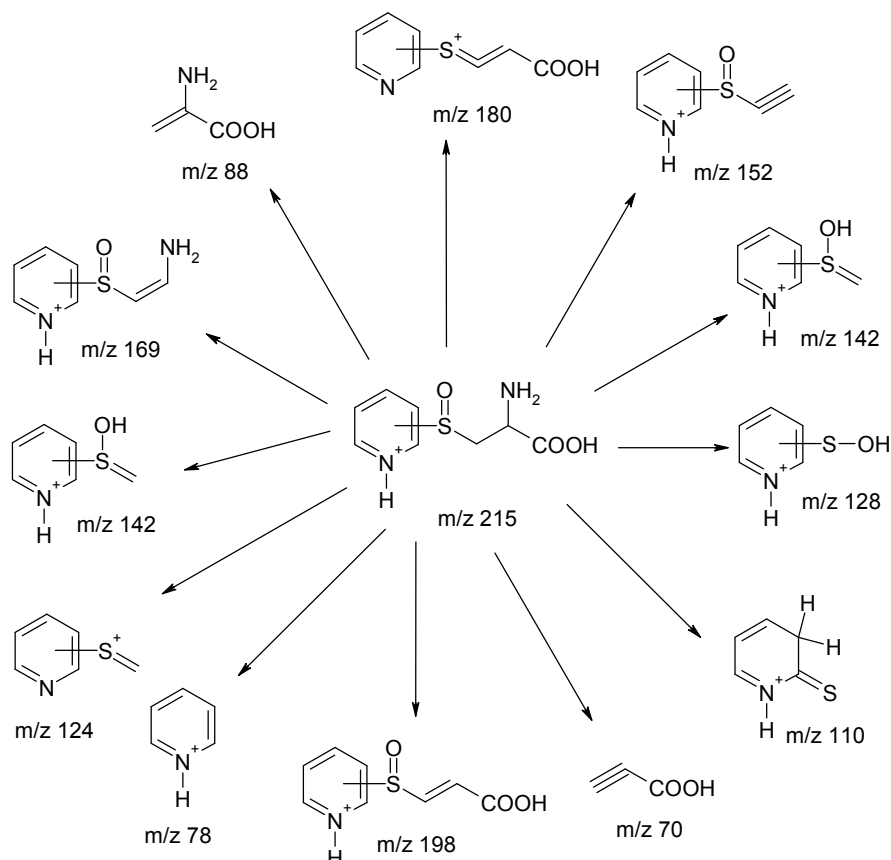


Abb. 3.56: Vorschlag zum Fragmentierungsmuster des Pyridinylcysteinsulfoxides aus *A. stipitatum*, pos. Ionisation

### 3.6.2 Versuche zur Umsetzung des putativen Pyridinylcysteinsulfoxides mit Enzymrohextrakten

Als Cysteinsulfoxid sollte das Pyridinylderivat durch Alliinase und das neu isolierte Enzym umgesetzt werden. Als Produkte sollten zunächst Thiosulfinate entstehen, die dann sofort zu weiteren Substanzen reagieren. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Farbstoff Precursor sind als Reaktionsprodukte Verbindungen ähnlich dem Farbstoff möglich.

Zur Untersuchung dieser Reaktionen wurde der Rohextrakt mit Enzymrohextrakten verschiedener Arten versetzt und die Reaktionsprodukte mittels HPLC/UV-MS untersucht (Methode beschrieben in Kapitel 2.10.2). Es wurde ein Wasser/Methanol-Gradient verwendet, analog dem zur Aufreinigung des Pyrrolylcysteinsulfoxides (Kapitel 2.5.2, mit positiver Ionisierung). Dazu sollten die Enzymrohextrakte von *A. stipitatum* und *A. macleanii* verwendet werden. Diese Arten wurden ausgewählt, um



einen Vergleich der Reaktionen mit dem Enzym der gleichen Art (*A. stipitatum*) und dem Enzym, das an der Farbstoffbildung beteiligt ist (*A. macleanii*) zu erhalten. Die Vermessung der Proben erfolgte sofort nach Zugabe des Enzyms und 24 Stunden später. Zum Vergleich diente jeweils eine Probe des Rohextraktes ohne Enzymzugabe.

#### 3.6.2.1 Ergebnisse der Umsetzung von *A. stipitatum* mit Enzymen direkt nach der Zugabe

Die UV-Spektren der HPLC-Trennungen nach der Zugabe der Enzymrohextrakte von *A. macleanii* und *A. stipitatum* sowie ohne Zugabe der Enzyme sind in Abbildung 3.57 wiedergegeben. In der Probe, in der kein Enzym zugegeben wurde, ist im UV-Spektrum ein deutlicher Peak bei 10,6 Minuten zu erkennen. Dieser entspricht dem putativen Pyridinylcysteinsulfoxid ( $m/z$  215). Die Retentionszeit unter diesen Bedingungen stimmt gut mit der vorgeschlagenen Struktur überein. Durch den Sechsring ist die Substanz etwas unpolarer als das entsprechende Pyrrol-Derivat aus *A. rosenorum* (Retentionszeit 7 Minuten). Sie ist wesentlich unpolarer als die anderen Cysteinsulfoxide, die unter diesen Bedingungen nicht getrennt werden können und bei ca. 6 Minuten eluierten. Des weiteren konnte auch das Cysteinsulfoxid Methiin nachgewiesen werden (Retentionszeit 6,0 Minuten,  $m/z$  152). Zusätzlich waren in dem Rohextrakt geringe Mengen von Substanzen mit  $m/z$  220 (36,7 Minuten) und  $m/z$  174 (33,6 Minuten) zu erkennen.

Nach Zugabe der Enzymrohextrakte wurde das Pyridinylcysteinsulfoxid umgesetzt. In den sofort vermessenen Proben waren nur noch Spuren nachzuweisen. Stattdessen verstärkte sich das Signal mit  $m/z$  220/439, besonders nach Zugabe des Enzymrohextraktes aus *A. stipitatum*. Die Zugabe des Enzymrohextraktes von *A. macleanii* führte daneben zu einem neuen Peak bei 7 Minuten, der nicht genauer identifiziert werden konnte. Auch Methiin wurde von beiden Enzymextrakten umgesetzt, allerdings nicht vollständig.

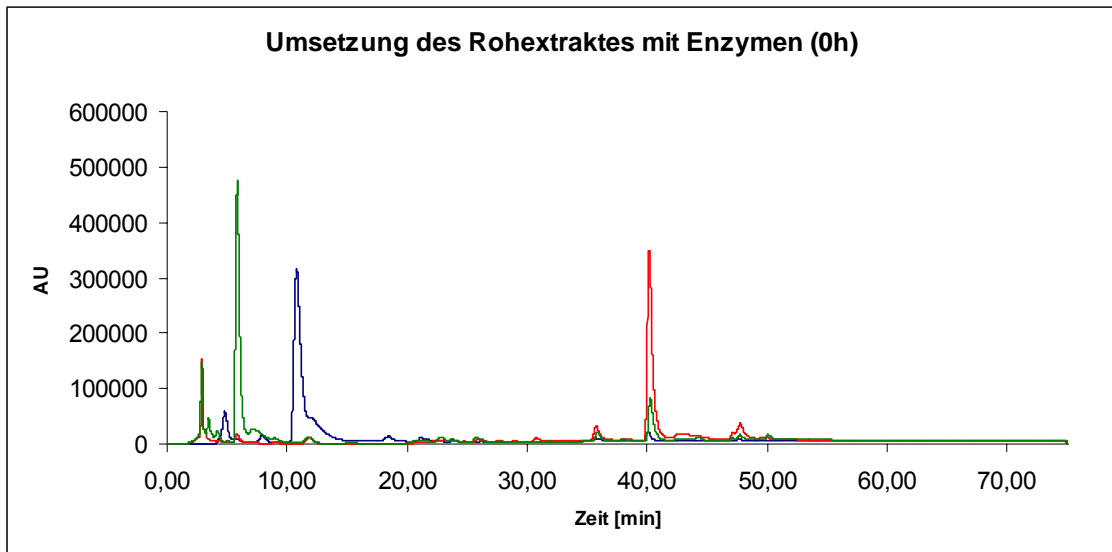


Abb. 3.57: UV-Signale der HPLC-Trennung der *A. stipitatum* Rohextrakte direkt nach Zugabe der Enzymrohextrakte: Blaue Linie: Rohextrakt ohne Enzymzugabe, rote Linie: Rohextrakt nach Zugabe eines Enzymrohextraktes aus *A. stipitatum*, grüne Linie: Rohextrakt nach Zugabe eines Enzymrohextraktes aus *A. macleanii*

Aus Abbildung 3.58 werden die Relationen der einzelnen Substanzen zueinander deutlich. Dargestellt werden hier die Massenspuren der einzelnen Substanzen in Abhängigkeit von der Zeit.  $m/z$  439/220 zeigt das mit Abstand deutlichste Signal. Daneben können auch alle anderen Substanzen detektiert werden.

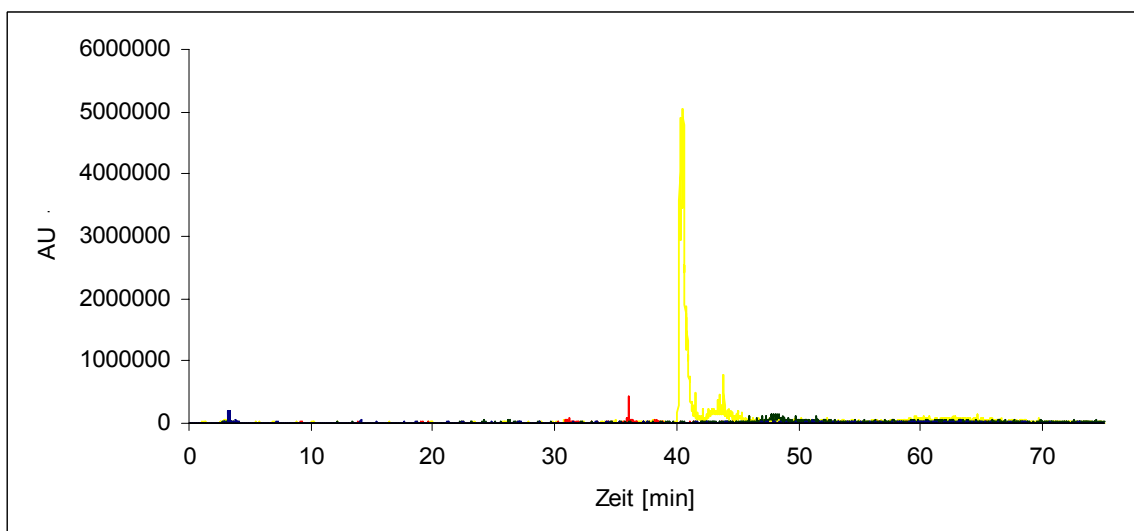


Abb. 3.58: Massenspektrum der Extrakte direkt nach Zugabe von Enzymrohextrakt von *A. stipitatum*: blaue Linie: Methiin ( $m/z$  152), schwarze Linie: putatives Pyridinylcysteinsulfoxid ( $m/z$  215), rote Linie:  $m/z$  174, gelbe Linie:  $m/z$  220 + 439, grüne Linie:  $m/z$  333

### 3.6.2.2 Ergebnisse der Umsetzung von *A. stipitatum* mit Enzymen 24 Stunden nach der Zugabe

24 Stunden nach Zugabe der Enzymrohextrakte stellte sich ein völlig anderes Bild dar. Die UV-Spektren dieser Messungen sind in Abbildung 3.59 wiedergegeben, die Massenspuren der untersuchten Substanzen für die mit einem Enzymrohextrakt aus *A. macleanii* versetzten Probe in Abbildung 3.60. Zum besseren Vergleich ist auch hier die Probe ohne Zugabe von Enzymrohextrakt wiedergegeben. In beiden mit Enzymrohextrakt versetzten Lösungen hat die Konzentration von  $m/z$  220/439 deutlich abgenommen. Deutlich verstärkt erschienen dagegen die Signale von  $m/z$  173 (33,5 Minuten) und  $m/z$  333 (42,6 Minuten).

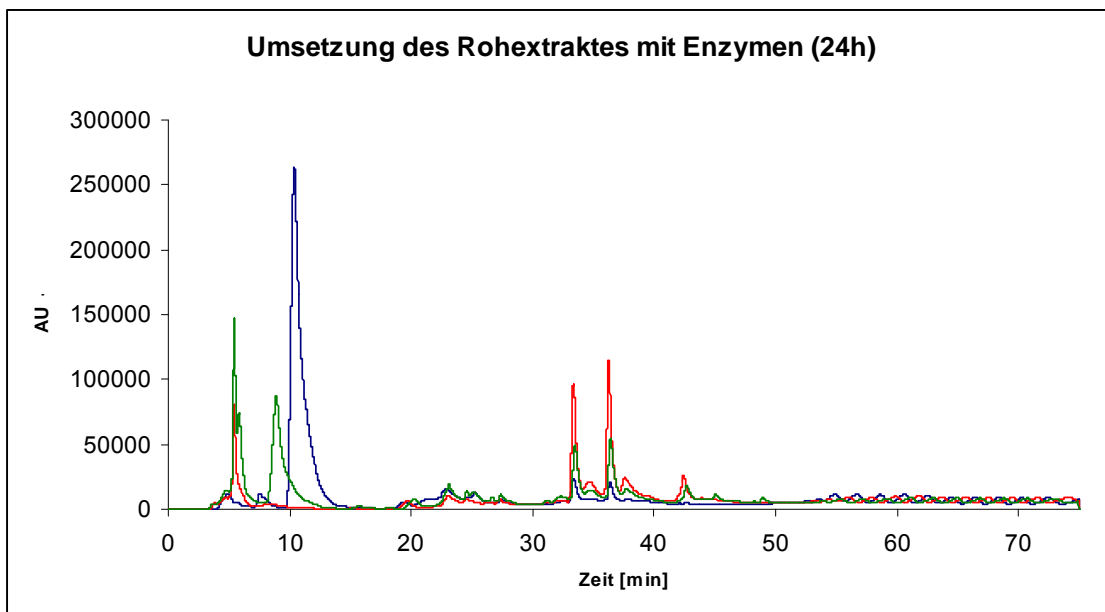


Abb. 3.59: UV-Signale der HPLC-Trennung der *A. stipitatum* Rohextrakte einen Tag nach Zugabe der Enzymrohextrakte: Blaue Linie: Rohextrakt ohne Enzymzugabe, rote Linie: Rohextrakt nach Zugabe eines Enzymrohextraktes aus *A. stipitatum*, grüne Linie: Rohextrakt nach Zugabe eines Enzymrohextraktes aus *A. macleanii*

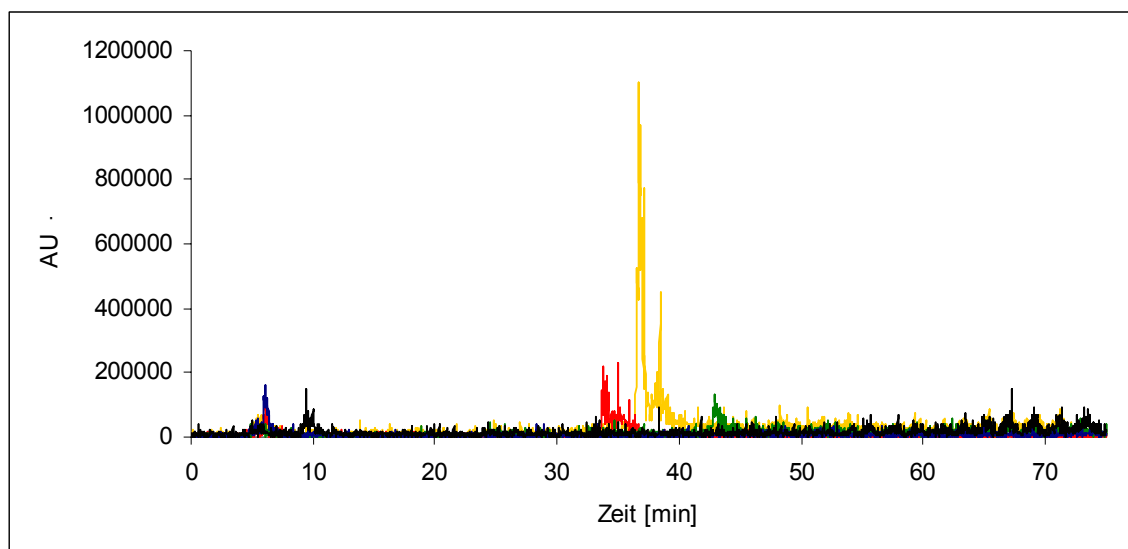


Abb. 3.60: Massenspektrum der Extrakte einen Tag nach Zugabe eines Enzymrohextraktes aus *A. stipitatum*: blaue Linie: Methiin ( $m/z$  152), schwarze Linie: putatives Pyridinylcysteinsulfoxid ( $m/z$  215), rote Linie:  $m/z$  174, gelbe Linie:  $m/z$  220 + 439, grüne Linie:  $m/z$  333

Diese Substanzen waren in den Proben, die mit dem Enzymrohextrakt aus *A. stipitatum* versetzt wurden, konzentrierter als die in den mit Enzymrohextrakt aus *A. macleanii* versetzten Proben.

In Tabelle 3.11 sind die prozentualen Zunahmen und Abnahmen der Produkte und Edukte direkt nach Zugabe der Enzymrohextrakte und 24 Stunden später zusammengefasst. Die Angaben beziehen sich auf die Intensität im Massenspektrum (Signalhöhe in cps). Der jeweils höchste Wert wurde als 100% angenommen.

In den Extrakten, denen kein Enzymrohextrakt zugesetzt wurde, befinden sich die höchsten Konzentrationen der Cysteinsulfoxide. Diese werden durch die Zugabe beider Enzymrohextrakte schnell umgesetzt. Der Abbau der Precursor ist nach Zugabe des Enzymrohextraktes aus *A. stipitatum* am schnellsten, es kann kein Pyridinylcysteinsulfoxid mehr nachgewiesen werden. Die Umsetzung des Methiins ist langsamer. Bereits in den Rohextrakten ohne Enzymzugabe kann ein Teil der Produkte nachgewiesen werden.

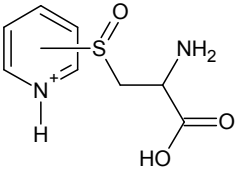
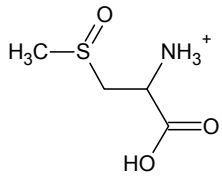
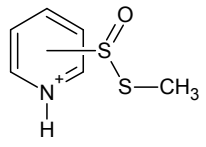
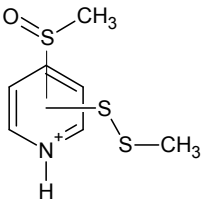
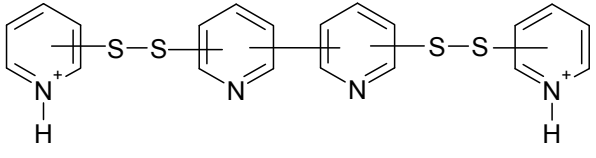
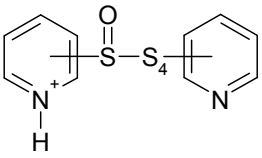
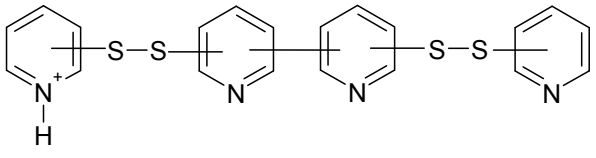
Bei der Reaktion entstanden außerdem weitere polarere Substanzen, die nicht näher bestimmt werden konnten.

m/z	0h			24h		
	Ohne Enzym	Enzym <i>A. stipitatum</i>	Enzym <i>A. macleanii</i>	Ohne Enzym	Enzym <i>A. stipitatum</i>	Enzym <i>A. macleanii</i>
<b>Abnahme des Precursors</b>						
<b>215</b>	100,0	0,0	46,4	100,0	0,0	81,9
<b>152</b>	100,0	26,4	14,3	100,0	65,1	28,0
<b>Zunahme der Produkte</b>						
<b>174</b>	17,8	100,0	21,9	6,9	66,3	47,6
<b>220 + 439</b>	5,2	100,0	8,7	11,5	17,6	13,5
<b>333</b>	0,0	38,7	0,0	0,0	100,0	92,6

Tab. 3.11 Veränderungen der Probenzusammensetzung nach Zugabe der Enzymrohextrakte aus *A. stipitatum* und *A. macleanii*

Die Strukturen, die sich aus den m/z-Werten für die Reaktion des Pyridinylcysteinsulfoxides und des Methiins mit einem Alliinase-ähnlichen Enzym ableiten ließen, sind in Tabelle 3.12 wiedergegeben. Diese Strukturen konnten nicht durch MS/MS-Messungen abgesichert werden.

Für m/z 219 kommen demnach zwei Strukturen in Frage. Eine der Strukturen ist das Dimer des Dithiopyridin. Mit einfacher Ladung ergibt sich m/z 439, mit einer doppelten Ladung m/z 220. Die zweite mögliche Struktur entspricht einem Methylpyridinyldisulfid, an dessen Pyridinring zusätzlich ein Methylsulfoxid gebunden ist (Tab. 3.12). Da m/z 439 und m/z 220 gleichzeitig eluierten, ist die erste Struktur allerdings wahrscheinlicher.

m/z	putative Struktur
215	
152	
174	
220	
	
333	
440	

Tab. 3.12: Mögliche Strukturen der nachgewiesenen Substanzen

### **3.7 Steroide in *Allium*-Arten**

Steroidsaponine rücken immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Sie sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt und für viele der isolierten Substanzen konnte eine pharmazeutische Wirkung belegt werden. Zahlreiche Steroide konnten auch aus *Allium*-Arten isoliert und charakterisiert werden. Als am weitesten verbreitete Spezies wurden hierbei *A. sativum* und *A. cepa* besonders gut untersucht, daneben auch diverse Spezies des Subgenus *Melanocrommyum*. Diese Arten sind besonders reich an Saponinen, es konnte eine Vielzahl neuer Verbindungen isoliert werden.

In *Melanocrommyum*-Arten konnten hauptsächlich Spirostanol- und Furostanol-Saponine, daneben aber auch Cholestanglykoside, Gitonine, Diosgeninsaponine, Alliogenin und dessen Derivate und Aginosid nachgewiesen werden. Einige dieser Substanzen weisen zytostatische oder zytotoxische Wirkungen auf [Mimaki et al. 1999, Inoue et al. 1995, Kawashima et al. 1991, Mimaki et al. 1994a/b].

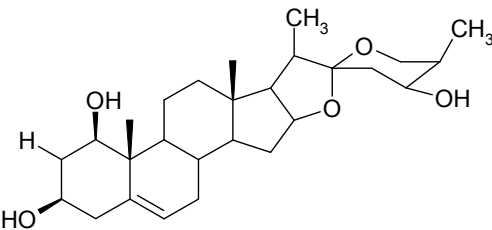
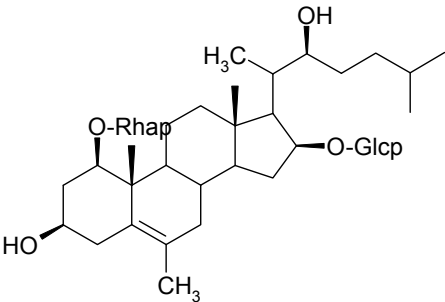
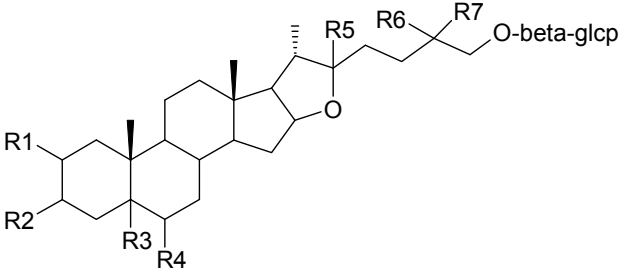
Zur Untersuchung der Steroide in verschiedenen *Melanocrommyum*-Arten wurden die Extrakte mit SPE-Kartuschen vorgereinigt und mittels HPLC-MS untersucht. Die nachgewiesenen Masse zu Ladungsverhältnisse wurden mit den in der Literatur für *Allium*-Arten beschriebenen Steroidglykosiden abgeglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst.

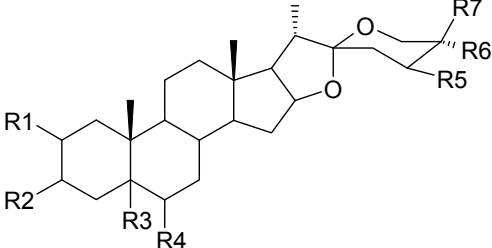
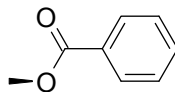
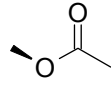
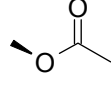
Die zugehörigen Strukturen sind in Tabelle 3.14 wiedergegeben.

Tab. 3.13: Steroidglycoside in den untersuchten Melanocrommyum-Arten (\* *A. macleanii* 2 oder *A. karataviense*; \*\* *A. karataviense* oder *A. giganteum* 2)

Spezies	<i>A. macleanii</i> 6240	<i>A. macleanii</i> Usbekistan	<i>A. macleanii</i> 6150	<i>A. jesdianum</i> 1178	<i>A. jesdianum</i> 1180	<i>A. rosenorum</i> 6153	<i>A. elburzense</i> 1208	<i>A. stipitatum</i> 1076
<i>A. jesdianum</i> 2	\	\	24,5 min	\	\	\	\	\
<i>A. macleanii</i> 2*	\	20,1 min	\	\	\	\	\	20,1 min
<i>A. giganteum</i> 1	\	\	\	18,0 min	18,0 min	\	\	\
<i>A. giganteum</i> 2**	23,9 min	\	\	\	\	\	\	\
<i>A. giganteum</i> 8	20,5 min	20,5 min	20,5 min	\	\	20,5 min	20,5 min	\
<i>A. macleanii</i> 1	27,0 min	27,0 min	27,0 min	27,0 min	27,0 min	27,0 min	27,0 min	27,0 min
<i>A. karataviense</i> 1	18,5 min	18,5 min	18,5 min	29,1 min	29,1 min	\	29,1 min	\
<i>A. karataviense</i> 6	\	\	25,8 min	\	\	\	\	\
<i>A. karataviense</i> 9	\	\	\	\	29,5 min	\	\	\
<i>A. karataviense</i> 12	\	\	\	\	29,7 min	\	29,7 min	29,7 min
Elburzensoid A	\	18,8 min	\	\	\	\	\	\
Elburzensoid C	25,9 min		\	\	\	\	\	\
Agapanthagen	18,5 min	18,5 min	18,5 min	\	\	\	\	\
Agapanthagen glucoside	\	\	\	33,5 min	\	\	\	\
Diosgenin	27,9 min	27,9 min	27,9 min	/	\	\	27,9 min	27,9 min
Cepagenin	18,7 min	18,7 min	18,7 min	18,7 min	\	\	18,7 min	\



Substanz	Struktur						
Cepagenin							
<i>A. jesdianum</i> 2							
							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Elburzensoid A	<OH	◀O-β-Glcp	<OH	◀OH	~OH	◀CH3	H
Elburzensoid C	<OH	◀O-β-Glcp	<OH	H	~OH	◀CH3	H
<i>A. karataviense</i> 12	<O-β-Glcp	◀OH	<OH	◀OH	-OCH3	<CH3	H

							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
<i>A. macleanii</i> 1	-O-β-D-glcp	◀OH	<OH	◀OH	-H	-CH3	-H
<i>A. macleanii</i> 2 <i>A. karataviense</i> 4	-O-β-D-glcp		<OH	-OH	-H	-CH3	-H
<i>A. karataviense</i> 1	<OH	◀OH	<OH	-OH	-H	<CH3	-H
<i>A. karataviense</i> 3 <i>A. giganteum</i> 2	<O-β-Glcp		<OH	-OH	-H	<CH3	-H
<i>A. karataviense</i> 9	<O-β-Glcp	◀OH	<OH	-OH	-O-β-glcp	<CH3	-H
<i>A. karataviense</i> 6	<OH	-O-β-glcp (1→2) [β-xylp (1→3)]-β-glcp (1→4)-β-galp	<OH	-OH	-H	<CH3	-H
<i>A. giganteum</i> 1	<O-β-Glcp		<OH	◀OH	◀OH	<CH3	-H
<i>A. giganteum</i> 8	<OH	◀OH	<OH	◀OH	-O-β-glcp	-CH3	-H
Agapanthagenin	<OH	◀OH	<OH	-H	-H	-CH3	-H
Agapanthagenin-glucoside	<OH	◀O-β-Glcp	<OH	-H	-H	-CH3	-H
Diosgenin	<H	◀OH	-H	◀H	-H	-CH3	-H

Tab. 3.14 Strukturen der Steroidglycoside (Mimaki et al. 1994a/b, Mimaki et al. 1999, Inoue et al. 1995, Kawashima et al. 1991, reviewed in Lanzotti 2006, Barile et al. 2004, 2005)

Es wurden also einige Steroidsaponine nachgewiesen, die bereits für *Allium*-Arten beschrieben sind. Einige der Saponine konnten nicht genauer bestimmt werden, da die m/z-Werte nur Unterscheidungen aufgrund des Molekulargewichtes ermöglichten. So unterscheiden sich *A. macleanii* 2 und *A. karataviense* 4 ebenso wie *A. karataviense* 3 und *A. giganteum* 3 nur in ihrer Stereochemie. Eine Differenzierung war somit mit dieser Methode nicht möglich. Zur Vereinfachung wurde in Tabelle 3.13 nur *A. macleanii* 2 und *A. giganteum* 2 angegeben, möglich sind beide Substanzen.

In allen untersuchten Arten konnte also *A. macleanii* 1 nachgewiesen werden. Daneben waren *A. giganteum* 8, *A. karataviense* 1, Diosgenin und Cepagenin ebenfalls in vielen der Proben enthalten. Alle anderen Substanzen waren in einzelnen Proben nachzuweisen.

Die vorliegenden Ergebnisse sind nur als vorläufige Ergebnisse anzusehen. Zur Bestätigung der Strukturen und der Substanzen in den Extrakten müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So müssen die Substanzen isoliert und charakterisiert, oder zumindest ein Abgleich gegen Standards durchgeführt werden. Auch MS/MS Experimente könnten näheren Aufschluss über die Strukturen geben.

### 3.8 Steroide in Arten der Gattung *Hoodia*

Bezüglich ihres Steroidgehaltes ist in den letzten Jahren eine Pflanzenfamilie in den wissenschaftlichen Blickpunkt gerückt. Ein Steroidglykosid P57 aus *Hoodia*-Arten konnte isoliert und dessen hungerunterdrückende Wirkung bewiesen werden [van Heerden et al. 1999, MacLean und Luo 2004]. Bei dem Oxypregnanglykosid P57 handelt es sich um 3 $\beta$ -[ $\beta$ -d-Thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -d-Cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -d-Cymaropyranosyl-oxy]-12- $\beta$ -Tigloyloxy-14 $\beta$ -Hydroxypregn-5-en-20-on (Abb. 3.61). Eine Quantifizierungsmethode für diese Substanz mittels HPLC wurde von Avula et al. publiziert [2006, 2007, 2008 a/b].

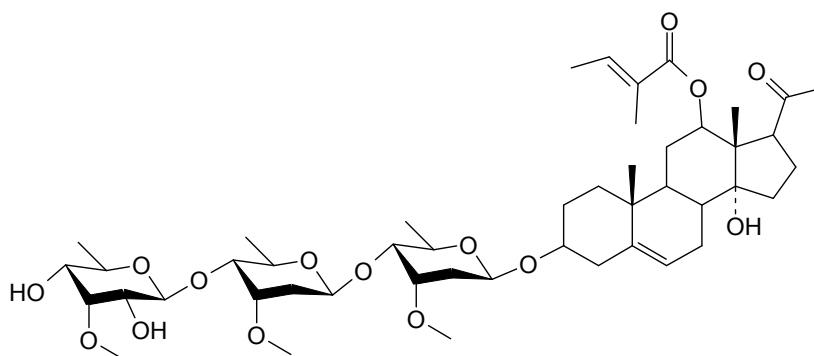


Abb. 3.61: Struktur des wirksamen Steroidglykosides (P57) aus *Hoodia* (MW: 878 g/mol)

In folgenden Untersuchungen wurden in den letzten Jahren weitere Steroidglykoside dieser Grundstruktur ermittelt (Abb. 3.62). [Dall'Acqua und Innocenti 2007, Pawar et al. 2007b] Insgesamt konnten 24 Steroidglykoside mit zwei bis fünf Zuckerresten identifiziert werden. Außerdem gelang der Nachweis von neun Calogenin Bidesmoside und ein Calogenin Monodesmosid in den überirdischen Teilen von *Hoodia gordonii* (Abb. 3.62). Allerdings hat sich bisher keine einheitliche Nomenklatur durchgesetzt. Daher wurden hier die Benennungen der einzelnen Autoren übernommen.

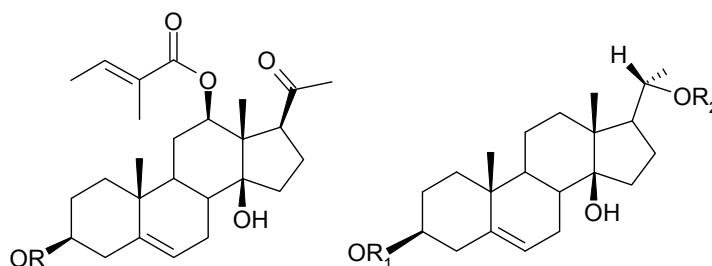


Abb. 3.62: Grundgerüst der Pregnanglycoside (12-O- $\beta$ -Tigloyl-3 $\beta$ ,14 $\beta$ -Dihydroxypregn-5-en-20-on) und der Calogenin Desmoside (Pregn-5-en-3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,20 $\beta$ -triol) in Hoodia-Spezies

### 3.8.1 Untersuchungen an einigen Extrakten aus Hoodia, Stapelia sowie verwandten Arten

Für die Vermarktung von *Hoodia*-Extrakten ist eine Standardisierung der Extrakte notwendig. Dazu müssen mehr Informationen über die Steroidglykoside und über deren Vorkommen in *Hoodia*-Arten bekannt sein. Hier sollten die Gehalte an Steroidglykosiden in verschiedenen Arten bestimmt und miteinander verglichen werden. Dies wäre zunächst der erste Schritt, da der Gehalt an Steroiden innerhalb einer Art stark schwankt. So kommt es zu Schwankungen in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen, dem Standort der Pflanze und natürlich auch von der Behandlung der Pflanzen nach der Ernte, wie den Lagerungsbedingungen und der Extraktionsmethode.

Zur Untersuchung wurden die lyophilisierten Pflanzenteile unter Rückfluss für 30 Minuten mit Methanol extrahiert. Die Aufreinigung der am Rotationsverdampfer eingeeengten Extrakte erfolgte über C18-SPE-Kartuschen. Zur Untersuchung der aufgereinigten Extrakte wurden HPLC-MS- und MS/MS-Messungen eingesetzt (Beschreibung der Methoden in Kapitel 2.12.1 und 2.12.2). Die Steroidglykoside in *Hoodia gordonii* konnten, wie in der Methode von Avula beschrieben, mittels UV Detektion bei 220 nm nachgewiesen werden.

Die wirksame Komponente P57 wurde aus *Hoodia gordonii* und *Hoodia piliiferum* isoliert, daneben sind allerdings noch einige andere *Hoodia* Arten bekannt. Einige weitere Arten, sowie nahe verwandte Arten, wie z.B. *Stapelia* Arten sollten hier auf ihr Steroidmuster mittels HPLC-MS untersucht werden. Gerade über *Stapelia* und die anderen verwandten Arten ist diesbezüglich wenig bekannt.

Zusätzlich sollte der Inhalt einer über das Internet bezogenen *Hoodia* Extrakt-Kapsel untersucht werden. Dieses, als Abnehmhilfe beworbene, Produkt soll einen Pulverextrakt von *Hoodia gordonii* enthalten.

### 3.8.1.1 MS/MS Messungen

Zum Nachweis der Steroidglykoside mit Pregnangrundgerüst erfolgte die Untersuchung der Extrakte von *Hoodia gordonii* mit MS/MS Messungen. Hierzu wurde zunächst ein Mutterionenscan auf das Pregnangrundgerüst ( $m/z$  313) durchgeführt (Abb. 3.63). Mit dieser Methode können alle Moleküle, die bei der Fragmentierung ein Fragment mit dem entsprechenden Masse zu Ladungsverhältnis bilden, detektiert werden. Die Messung führte zu einer Vielzahl von Substanzen mit  $m/z$  600 bis 1400. Das von van Heerden [1999] beschriebene P57 war jedoch nicht nachweisbar. Daher wurden die beiden Substanzen mit dem höchsten Signal,  $m/z$  1040 und 1024, näher betrachtet.

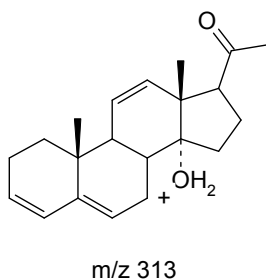


Abb. 3.63: Struktur des Pregnangrundgerüsts, das als Fragment bei MS/MS Experimenten entsteht ( $m/z$  313)

Hierzu erfolgte zunächst die Untersuchung des Fragmentierungsmusters, um genauere Informationen zur Struktur dieser Moleküle zu erlangen. Das MS/MS Spektrum von  $m/z$  1040 ist in Abbildung 3.64 wiedergegeben.

## Ergebnisse

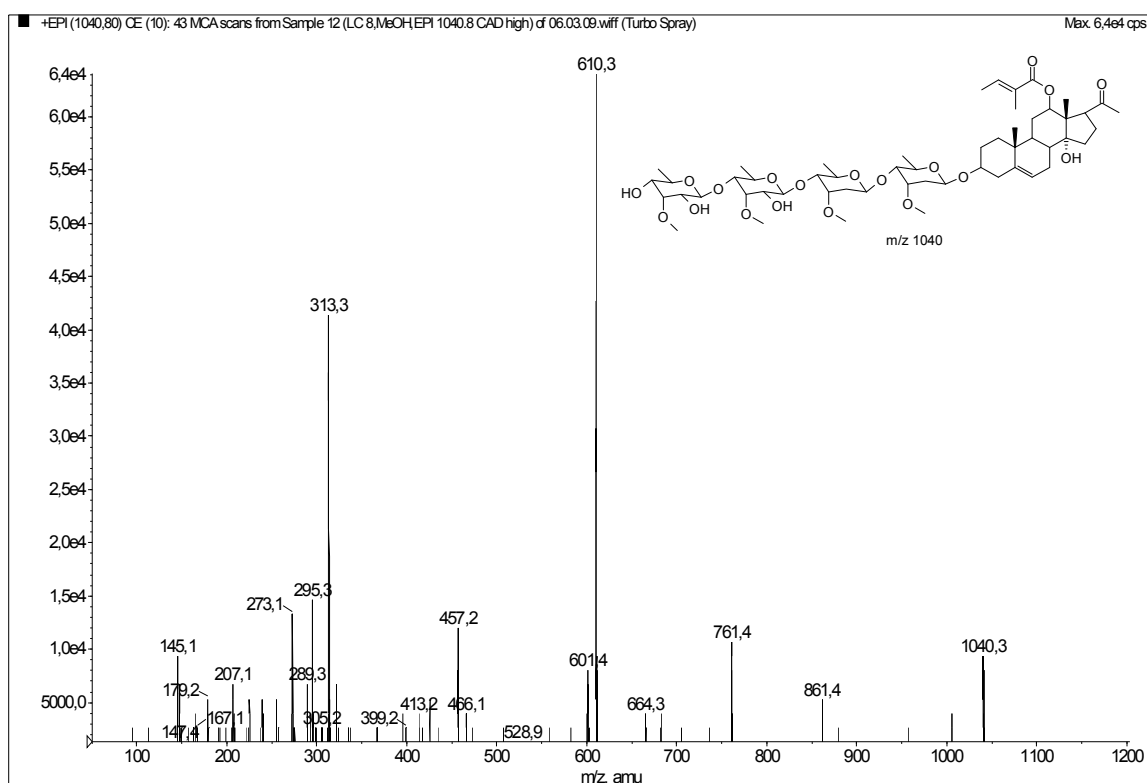


Abb. 3.64: MS/MS Spektrum von m/z 1040, das Fragmentierungsmuster deutet auf das dargestellte Pregnanglykosid hin

Aus diesem Fragmentierungsmuster kann auf das in der Abbildung 3.64 wiedergegebene Pregnanglykosid mit vier Zuckerresten geschlossen werden. Die Fragmente hierzu sind in Abbildung 3.65 und 3.66 wiedergegeben. Es handelt sich also vermutlich um Hoodigiosid D [Dall'Acqua und Innocenti 2007].

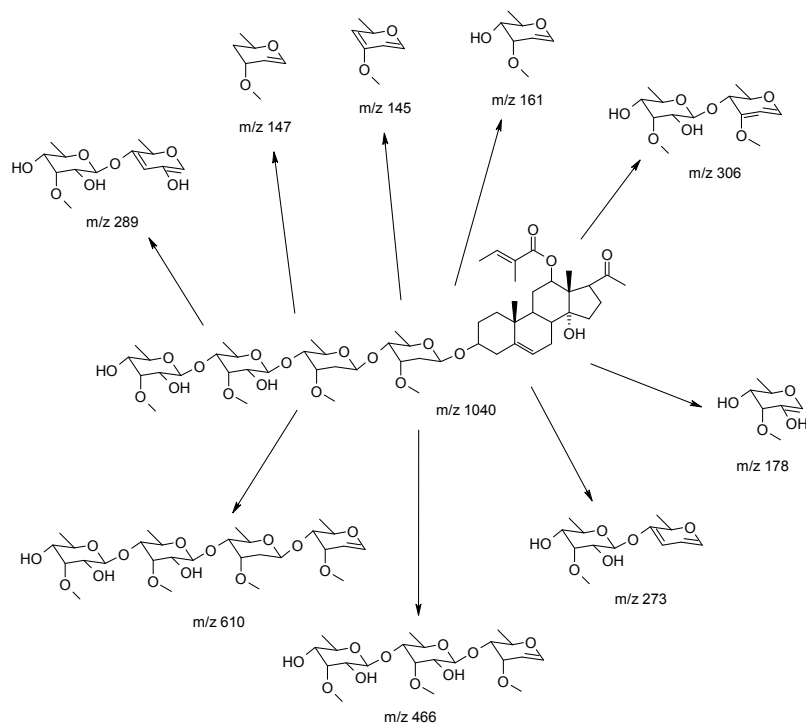


Abb. 3.65 Mögliche Strukturen der Fragmente der MS/MS-Messungen von m/z 1040 (Teil 1)

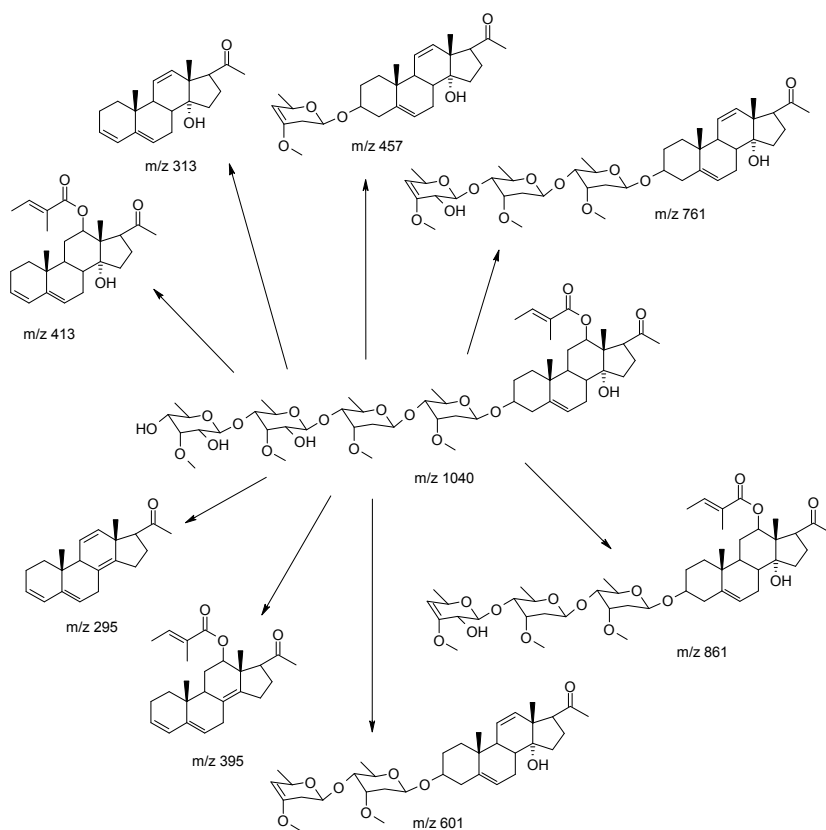


Abb. 3.66: Mögliche Strukturen der Fragmente der MS/MS-Messungen von m/z 1040 (Teil 2)



Des weiteren wurde die Substanz mit  $m/z$  1024 näher untersucht. Auch hier wurden zunächst MS/MS Messungen durchgeführt. Das Fragmentierungsmuster von  $m/z$  1024 ist in Abbildung 3.67 wiedergegeben und deutet auf ein Pregnanglykosid mit vier Zuckerresten hin (Abb. 3.68).

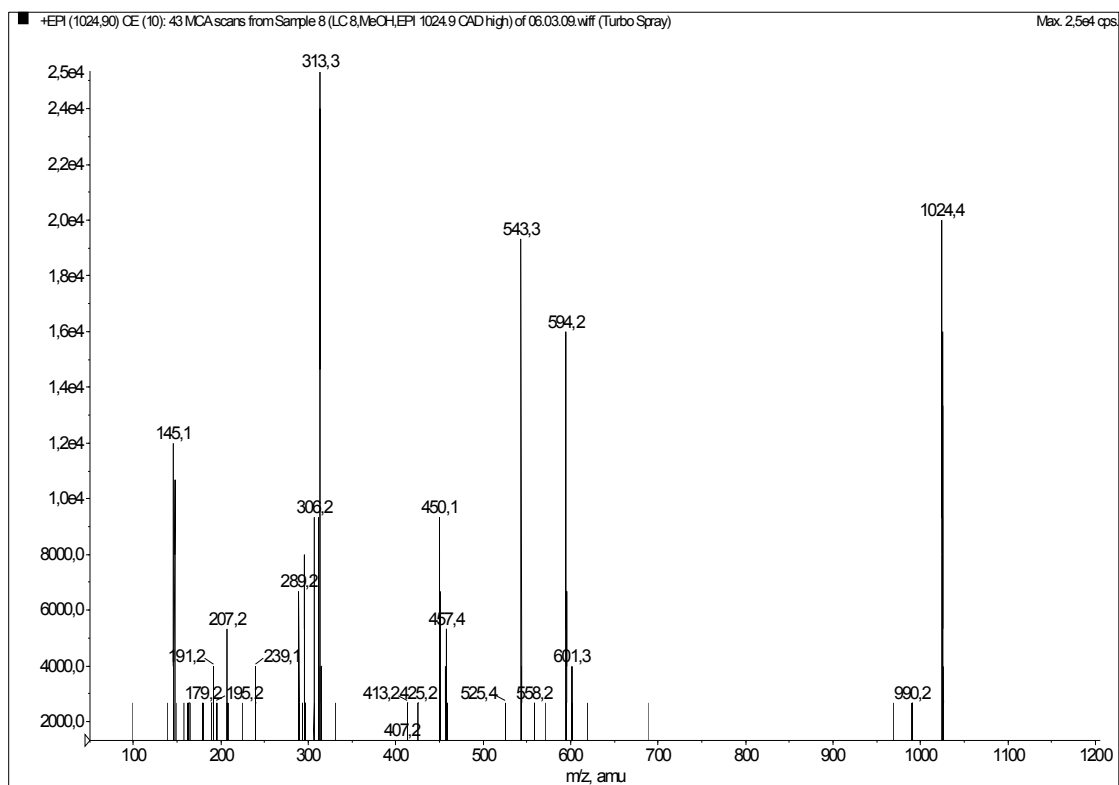


Abb. 3.67: MS/MS Spektrum von  $m/z$  1024, das Fragmentierungsmuster deutete auf ein Pregnanglykosid mit vier Zuckerresten hin

Ein Vergleich mit  $m/z$  1040 lässt auf große strukturelle Ähnlichkeiten schließen. Eine Gegenüberstellung der Schlüsselfragmente von  $m/z$  1040 und  $m/z$  1024 ist in Tabelle 3.15 wiedergegeben.

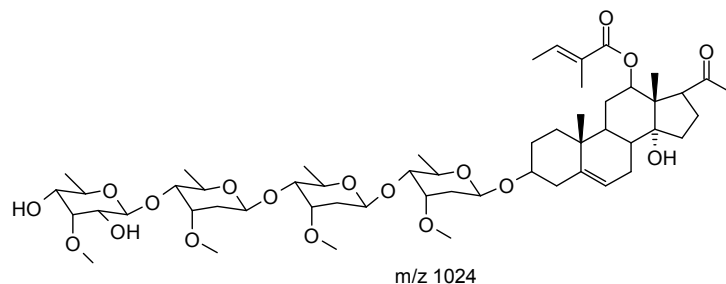
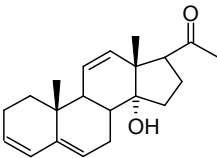
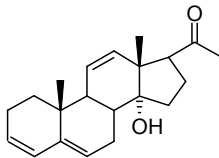
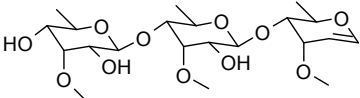
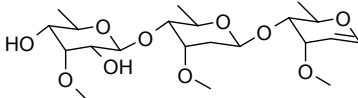
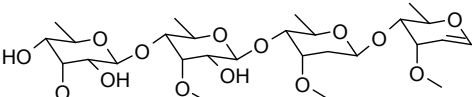
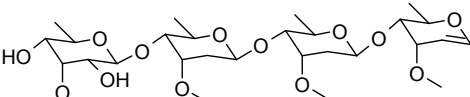
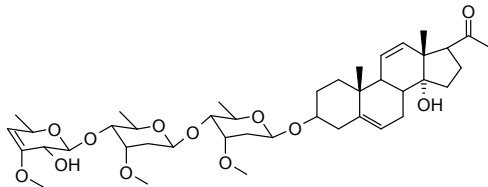
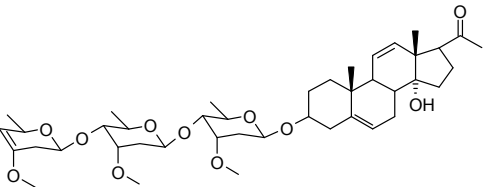


Abb. 3.68: Mögliche Struktur von  $m/z$  1024

m/z	Fragment m/z 1040	m/z	Fragment m/z 1024
313		313	
466		450	
610		594	
761		745	

Tab. 3.15: Vergleich der Schlüsselfragmente von m/z 1040 und m/z 1024

Ein Vergleich der Fragmente ergibt, dass der dritte Zucker in der Kette reduziert vorliegt. Das Pregnanglykosid enthält demnach Cymaropyranose, anstelle der Thevetopyranose in Hoodigioside D. Demnach handelt es sich um Hoodigioside C [Dall'Acqua und Innocenti 2007].

### 3.8.1.2 HPLC-MS Messungen der Extrakte

Zusätzlich wurden die Extrakte mittels HPLC-MS untersucht, um einen Überblick über die enthaltenen Steroide zu erhalten und die Arten untereinander zu vergleichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst. Die Identifizierung erfolgte hierbei nur über einen Abgleich der Molekulargewichte mit den nachgewiesenen Masse zu Ladungsverhältnissen. Die Daten geben daher nur Hinweise auf die vorhandenen Steroide, können deren Vorkommen aber nicht beweisen. Hierzu wäre ein Abgleich mit Standardsubstanzen oder eine Isolierung und Strukturaufklärung nötig. Die Strukturen der angegebenen Steroidglykoside sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Wie Tabelle 3.16 zu entnehmen ist, konnten einige der beschriebenen Steroidglykoside in *Hoodia* und in verwandten Arten detektiert werden. Zur Vereinfachung wurden in Tabelle 3.16 jeweils nur ein Substanzname angegeben. Dabei sind allerdings mehrere Substanzen mit demselben Molekulargewicht denkbar. Eine Unterscheidung war mit der verwendeten HPLC-MS Methode nicht möglich. Auffällig ist, dass bei einigen Substanzen unterschiedliche Retentionszeiten in den einzelnen Spezies auftraten. Dies war mit den verschiedenen Strukturen zu erklären. So können Steroide mit unterschiedlichen Zuckerresten auftreten, die sich nicht in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Beispiele hierfür sind Gordonosid E, F und G. Auch bei Steroiden, für deren Molekulargewicht nur eine Struktur bekannt ist, wie Hoodigosid K, L, N, O und P ist dies möglich. Es könnten in der Literatur noch nicht beschriebene Steroidglykoside enthalten sein. Auch hier kann es sich um Variationen der Zuckerreste zu den bekannten Substanzen handeln.

Die in den *Hoodia*-Arten am häufigsten vorkommenden Steroide sind Hoodigosid C, M, N, O und Gordonosid E. In den anderen Arten sind hauptsächlich Hoodigosid B, D, K und O enthalten. Die Kapsel enthält Hoodigosid A, C, D, E, K, L und O. P57 ist neben *Hoodia gordonii* 1 und 2 auch in *Hoodia ruschii* und *Hoodia juttae* sowie in *Stapelia grandiflora* und *Stapelia gigantea* enthalten.

Auch hier sind die Ergebnisse nicht eindeutig. Um die Strukturen der nachgewiesenen Substanzen zu verifizieren, müssten weitere MS/MS Experimente und eine weitere Aufreinigung der Extrakte durchgeführt werden.

	<i>Hoodia gordonii</i> 1	<i>Hoodia gordonii</i> 2	<i>Hoodia gordonii</i> 3	<i>Hoodia pilifera</i>	<i>Hoodia bradei</i>	<i>Hoodia ruschii</i>	<i>Hoodia juttae</i>	<i>Hoodia flavum</i>	<i>Hoodia currorii</i>
Hoodigiosid A	33,7 min	33,7 min	/	/	/	/	33,7 min	/	33,7 min
Hoodigiosid B	/	/	/	/	/	/	/	/	31,5 min
Hoodigiosid C	/	32,2 min	32,2 min	/	32,2 min	32,2 min	32,2 min	/	/
Hoodigiosid D	/	32,2 min	/	/	/	32,2 min	/	/	/
Hoodigiosid E	30,4 min	30,4 min	/	/	/	33,9 min	/	/	/
Hoodigiosid F	/	/	27,4 min	/	33,8 min	/	/	/	/
Hoodigiosid K	/	32 min	32 min	/	/	/	/	32 min	/
P57	31,6 min	31,6 min	/	/	/	31,6 min	31,6 min	/	/
Gordonosid D	/	/	/	/	30,8 min	/	30,8 min	/	/
Gordonosid E	33,3 min	33,3 min	33,3 min	/	33,3 min	33,3 min	33,3 min	33,3 min	33,3 min
Gordonosid L	/	34,6 min	/	/	34,6 min	/	/	34,6 min	/
Hoodigiosid L	/	28,3 min	/	/	/	28,3 min	/	/	/
Hoodigiosid V	/	/	/	/	/	32,7 min	/	/	/
Hoodigiosid M	/	28,0 min	28,0 min	28,0 min	28,0 min	28,0 min	28,0 min	/	/
Hoodigiosid N	33,0 min	/	/	33,0 min	/	/	33,0 min	33,0 min	25,3 min
Hoodigiosid O	32,4 min	32,4 min	/	/	32,4 min	32,4 min	32,4 min	/	32,4 min
Hoodigiosid P	/	/	34,0 min	/	/	/	34,0 min	/	/

	Stapelia grandiflora	Stapelia gigantea	Stapelia leendertziae	Quaqua mamillaris	Tromotriche revoluta	Orbea decaisneana	Kapsel
Hoodigiosid A	/	/	33,7 min	/	/	/	33,7 min
Hoodigiosid B	31,5 min	31,5 min	31,5 min	31,5 min	31,5 min	/	/
Hoodigiosid C	/	32,2 min	/	/	/	/	32,2 min
Hoodigiosid D	/	32,2 min	32,2 min	/	/	32,2 min	32,2 min
Hoodigiosid E	/	/	/	/	/	/	33,9 min
Hoodigiosid F	/	/	/	/	/	/	/
Hoodigiosid K	32 min	32 min	32 min	/	/	26,5 min	26,5 min
P57	31,6 min	31,6 min	/	/	/	/	/
Gordonosid D	/	/	30,8 min	/	/	/	/
Gordonosid E	/	/	/	33,3 min	/	/	/
Gordonosid L	/	/	/	/	/	/	/
Hoodigiosid L	/	/	/	/	/	/	31,7 min
Hoodigiosid V	/	/	/	/	32,7 min	/	/
Hoodigiosid M	/	/	/	/	/	/	/
Hoodigiosid N	/	30,4 min	/	25,3 min	/	/	/
Hoodigiosid O	/	32,4 min	/	32,4 min	/	32,4 min	32,4 min
Hoodigiosid P	/	27,2 min	/	/	/	/	/

Tab. 3.16: Zusammenfassung der Ergebnisse der HPLC-MS Messungen (Hoodigiosid C: Gordonosid 3/B, Formel 12, compound 2; Hoodigiosid E: Gordonosid 8; Hoodigiosid F: Hoodigiosid G; Gordonosid D: Formel 8; Gordonosid E: Gordonosid F/G, Formel 9/10; Gordonosid L: Formel 11) (Quelle: Pawar et al. 2007a; Dall'Acqua und Innocenti 2007; Pawar et al. 2007b, van Heerden et al. 1999; Abrahamse et al. 2007)

## **4. Diskussion**

### **4.1 Isolierung des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides**

#### **4.1.1 Rolle des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides in der Bildung des roten Farbstoffes**

Ein Biogeneseweg für die Bildung des Farbstoffes in *Allium* Subgenus *Melanocrommyum* Arten wurde bereits von Jedelská [2007] postuliert. Dieses Biogeneseschema nimmt ein S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid als Ausgangssubstanz für die Bildung des Farbstoffes an (siehe Abb. 4.1). Durch eine Alliinase-ähnliche Reaktion wird diese Substanz in Pyrrolsulfensäure, Pyruvat und Ammoniak umgewandelt. Das in diesem Schritt entstehende Sulfenat kondensiert mit Pyruvat zu einem Semithioketal, das von Jedelská nachgewiesen werden konnte. Das Semithioketal könnte zu einem Thiosulfinat substituiert mit zwei Pyrrolringen reagieren. Dies wäre in Übereinstimmung mit dem Reaktionsmodell der Reaktion der Cysteinsulfoxide mit Alliinase [Krest 2000a]. Eine spontane Abspaltung von Wasser führt zu dem Dithiodipyrrol. Dieser Verlauf stimmt mit den Reaktionen der chemisch verwandten Phenoxymethylphenylsulfoxide überein, die chemisch sehr instabil sind [Maricich und Harrington 1972].

Die Theorie zum Ablauf der Biogenese des roten Farbstoffes konnte durch diese Arbeit unterstützt werden. Die Ausgangssubstanz war bisher hypothetisch und konnte noch nicht nachgewiesen werden. Mit der Isolierung des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid konnte ein Kernpunkt des Biogeneseschemas untermauert werden. Es handelte sich um die Ausgangssubstanz der Reaktionskaskade. Das Isolat war stabil und in relativ hohen Konzentrationen in der Pflanze enthalten. Vermutlich ist dieses Cysteinsulfoxid in der intakten Pflanze stabil, bis es zu einer Verletzung der Zellen kommt. In der Natur können diese Zellverletzungen durch Pflanzenschädlinge, Pathogene, Bakterien und Pilze oder auch durch Tiere entstehen. Dies lässt auf eine räumliche Trennung des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides von den abbauenden Enzymen in der Zelle schließen. Die anderen Cysteinsulfoxide wie Alliin, Isoalliin, Methiin und Propiin aus *Allium*-Arten werden von dem Enzym Alliinase bei Verletzung der Zellen umgesetzt. In der intakten Zelle befinden sich die Cysteinsulfoxide im Cytosol, die Alliinase dagegen in der Vakuole. Enzym und Substrat kommen erst durch eine Verletzung der Zelle in Kontakt. Eine analoge räumliche Trennung des Enzyms und des Precursors wäre auch in diesem Fall denkbar, konnte aber nicht nachgewiesen werden.

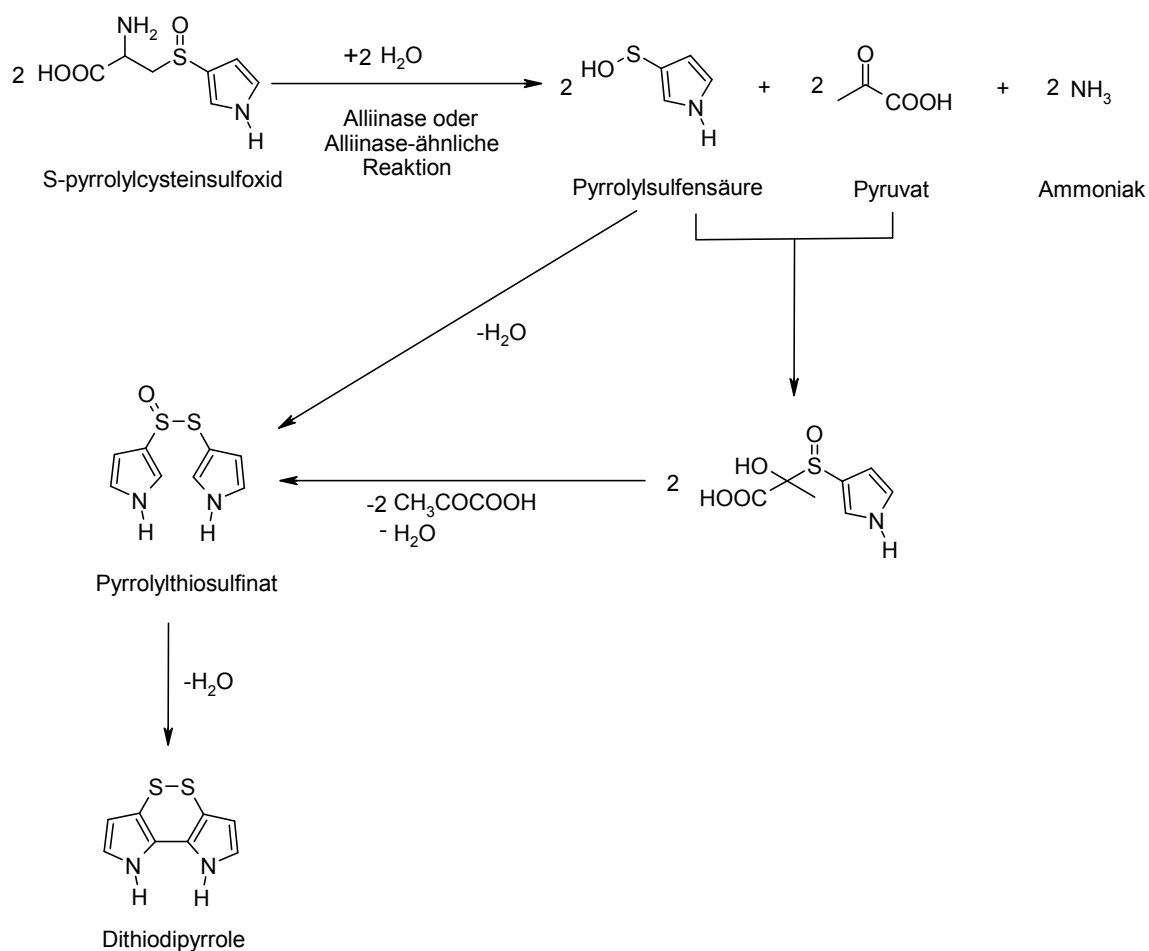


Abb.4.1 Hypothetisches Biogeneseschema des Dithiodipyrrols aus S-(3-Pyrrolyl)Cysteinsulfoxid in Arten des subgenus *Melanocrommyum* (nach Jedelská, 2007)

Insgesamt scheint die gesamte Enzymkaskade, die zur Bildung des roten Farbstoffes führt, komplexer zu sein als die entsprechenden Reaktionen, die für den Knoblauch beschrieben sind. Alliin und andere Cysteinsulfoxide wie der Precursor sind hier verantwortlich für die Bildung von flüchtigen Schwefelkomponenten. Alliin reagiert dabei beispielsweise mit dem Enzym Alliinase zu Allylsulfensäure (vergleichbar mit Pyrrolylsulfensäure), die dann spontan zu Allicin kondensiert (vergleichbar mit Pyrrolylthiosulfinat).

#### **4.1.2 Mögliche Biosynthese des L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides**

Die neu isolierte Substanz gehört zur Klasse der Cysteinsulfoxide. Die vier am häufigsten vorkommenden Cysteinsulfoxide sind Methiin, Alliin, Isoalliin und Propiin (die Strukturen sind in Abbildung 1.2 wiedergegeben). Die Biogenese dieser Substanzen wird seit mehreren Jahren untersucht, ist aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit dieser Substanzen mit dem neu isolierten Pyrrol-Derivat kann von ähnlichen Reaktionen zur Biosynthese ausgegangen werden.

##### **4.1.2.1 Biogenese der bekannten Cysteinsulfoxide**

Die Biogenesewege der vier am häufigsten vorkommenden Cysteinsulfoxide Methiin, Alliin, Isoalliin und Propiin werden bereits seit den 1940er Jahren untersucht. Seither konnten große Fortschritte verzeichnet werden, aber dennoch konnte die Biosynthese dieser wichtigen Sekundärmetabolite bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

Eine wichtige Funktion scheinen die  $\gamma$ -Glutamylpeptide zu besitzen, von denen bisher etwa 24 Typen isoliert werden konnten [Rose et al. 2005]. Diese werden als Speicherstoffe für Schwefel und Stickstoff diskutiert und könnten damit auch eine Rolle als Speichersubstanzen der Cysteinsulfoxide spielen. Lancaster et al. haben bereits 1989 ein mögliches Biogeneseschema veröffentlicht, das bis heute weitestgehend akzeptiert wird. Hierbei bilden sich zunächst die entsprechenden  $\gamma$ -Glutamylpeptide, aus denen dann Cysteinsulfoxide freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu geht eine zweite Theorie von Edwards et al. [1994] von einer direkten Bildung der Sulfoxide unter Umgehung der Peptide aus.

Lancaster et al. verwendeten für ihre Untersuchungen seneszente Blätter und untersuchten den Einbau von radioaktiv markiertem Sulfat in den Stoffwechsel. Dieses wird hierbei zunächst über die Wurzelplasmamembran in die Pflanze transportiert und akkumuliert in der Zelle. Der erste Schritt zur Assimilation des Sulfates stellt dann eine Reduktion dar, da es aufgrund seiner geringen Reaktivität nicht direkt für den Einbau zur Verfügung steht, sondern erst aktiviert werden muss. In den Plastiden wird es von dem Enzym ATP-Sulfurylase in 5-Adenylylsulfat (APS) umgewandelt (Abb. 4.2). Im folgenden sind zwei alternative Reaktionswege möglich. Zum einen kann APS weiter reduziert werden zu Cystein als Endprodukt; zum anderen kann Sulfat direkt in organische Moleküle eingebaut werden [Leustek et al. 1999].



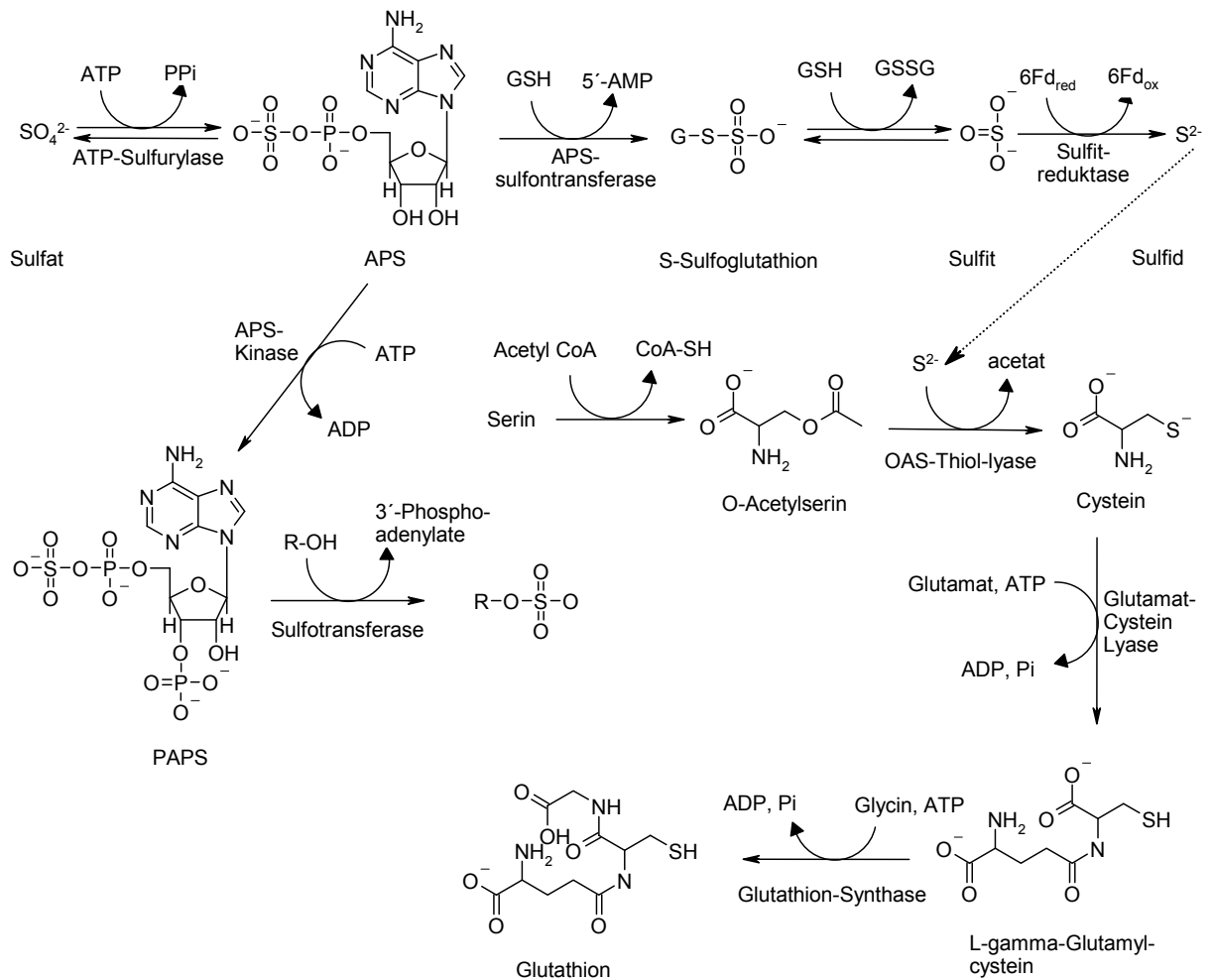


Abb. 4.2: Assimilation von Sulfat in Pflanzen (nach Leustek et al. 1999)

In der Reaktion zu Cystein wird APS zunächst von APS-Reduktase in Sulfid unter Umsetzung von GSH zu GSSG umgewandelt. Dieses wird durch Sulfid-Reduktase unter Oxidation von Ferredoxin zu Sulfid reduziert. Das Sulfid reagiert schließlich katalysiert durch die OAS-Thiollyase mit O-Acetylserin zu Cystein. Das O-Acetylserin entsteht hierbei durch Acetylierung von Serin mit Serin-Acetyltransferase. Das entstandene Cystein wird schnell in zahlreiche Stoffwechselwege aufgenommen, so wie auch in den Glutathion-Zyklus [Rose et al. 2005, Leustek et al. 2000]. Für die direkte Sulfatisierung von Molekülen wird zunächst ein Phosphatrest von ATP auf APS

durch die APS-Kinase übertragen. Das entstehende 3'-Phospho-5'-Adenylylsulfat (PAPS) wird von Sulfotransferasen im Cytosol weiter umgesetzt [Leustek et al. 2000].

Im Glutathion-Zyklus entsteht aus Glutaminsäure und Cystein Glutathion ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin). Dieses Tripeptid weist eine ungewöhnliche  $\gamma$ -Amidbindung auf und spielt eine wichtige Rolle in einer Reihe von Stoffwechselprozessen. Durch das Gleichgewicht zwischen der reduzierten Form (GSH) und der oxidierten Form (GSSG) können die Sulfhydrylgruppen von Proteinen geschützt und in der richtigen Oxidationsstufe gehalten werden. Im  $\gamma$ -Glutamyl-Zyklus wird Energie über die Synthese und den Abbau von GSH frei. Dadurch wird der Transport der Aminosäuren in der Zelle ermöglicht. Es wird geschätzt, dass etwa ein Drittel des Cysteins sofort in den Glutathion-Zyklus eingeht [Jones et al. 2004].

Die vermutete Biosynthese der Cysteinsulfoxide Methiin, Isoalliin und Propiin ausgehend von Glutathion ist in Abbildung 4.3 wiedergegeben [Lancaster et al. 1989a/b]. Der erste Schritt ist hierbei die Addition von Methacrylsäure, bzw. einer  $\text{CH}_3$ -Gruppe an die freie SH-Gruppe des Glutathions. Die Methacrylsäure stammt dabei aus der Aminosäure Valin. Methacrylyl-CoA ist ein Intermediat im Valin-Katabolismus. Die Quelle für die Methylgruppe konnte dagegen noch nicht aufgeklärt werden. In einem nächsten Schritt wird zunächst Glycin abgespalten. Aus den Methacrylsäure-Addukten wird im Anschluss eine Carboxylatgruppe abgespalten. Hierdurch entstehen das Propyl- und das Isoallyl-Derivat. Die Oxidation der Sulfidgruppe zum Sulfoxid erfolgt durch eine Oxidase, die anschließende Abtrennung des Glutamatrestes durch Katalyse einer  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase. Die Enzyme, die an der Biosynthese beteiligt sind, scheinen über eine breite Substratspezifität zu verfügen. So katalysieren sie in Teilschritten die Reaktionen aller Vorläufer und führen bei einem entsprechenden Angebot an Vorläufersubstanzen auch zu den Endprodukten, die von der Pflanze normalerweise nicht gebildet werden, wie Ethiin aus Zwiebelwurzel- Zellkulturen.

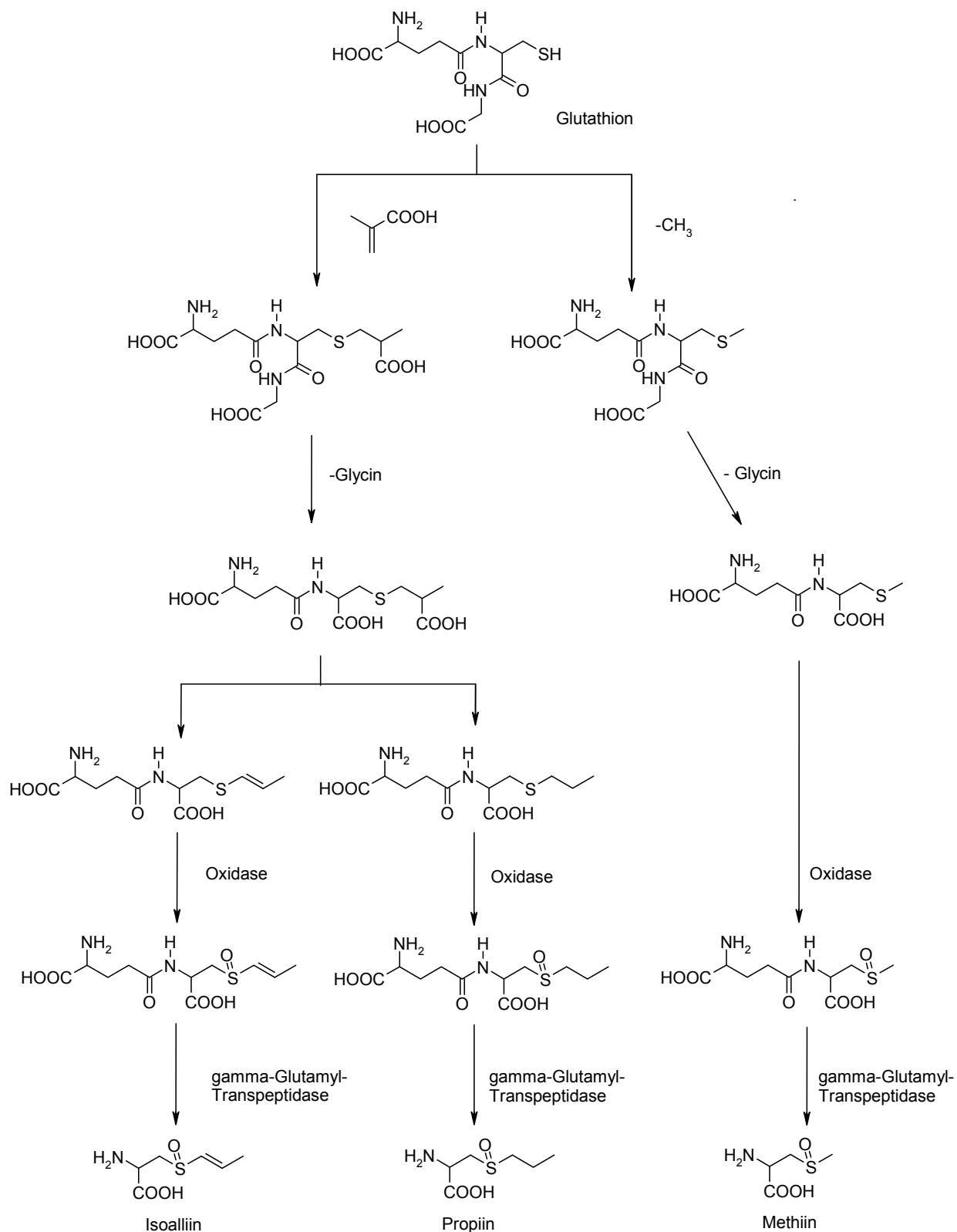


Abb. 4.3: Vermuteter Biogeneseweg der Cysteinsulfoxide Isoalliin, Methiin und Propiin (nach Lancaster et al. 1989)

Für die Biosynthese des Alliins sind die Ergebnisse nicht eindeutig (Abb. 4.4). Möglich ist hier die analoge Synthese aus Glutathion mit Methacrylsäure. Durch Abspaltung der Carboxylgruppe könnte sich hier das Allyl-Derivat bilden. Nach Oxidation der Sulfidgruppe und Abspaltung des Glutamatrestes entsteht dann Alliin. Eine zweite Möglichkeit ist die direkte Biosynthese aus Serin und Allylthiol.

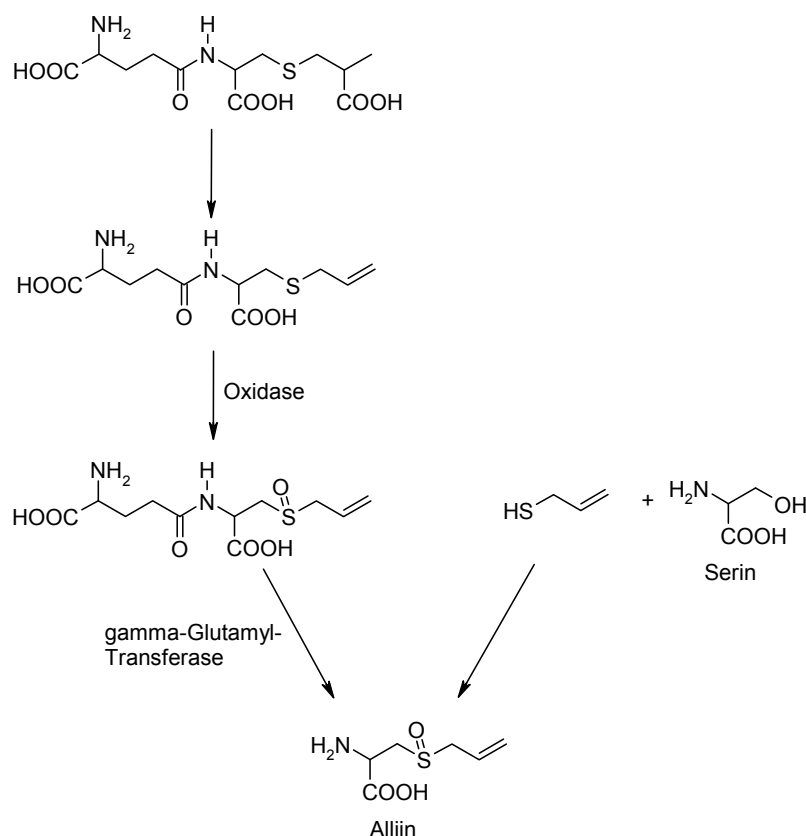


Abb. 4.4: Mögliche Biogenesewege des Alliins

Es wird noch ein anderer Weg für die Bildung der Cysteinsulfoxide diskutiert. Die Forschungsergebnisse von Edwards et al [1994] lassen auf eine direkte Bildung der Cysteinsulfoxide unter Umgehung der  $\gamma$ -Glutamylpeptide schließen. Die direkte Synthese der Cysteinsulfoxide erfolgt demnach über die Alk(en)ylierung von Cystein, bzw. Thioalk(en)ylierung von O-Acetylserin mit folgender Oxidation. Dieser hypothetische Biosyntheseweg beruht auf dem Nachweis von Methacrylsäure in *Allium* und der Beobachtung, dass diese mit Cystein reagiert.

Die unterschiedlichen Ergebnisse können möglicherweise durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklärt werden. Lancaster et al. verwendeten für ihre Experimente abgetrennte seneszente Blätter, während Edwards et al. intakte sprießende Zwiebelknollen verwendeten. Dies könnte ein Indiz für unterschiedliche Biogenesewege in unbeschädigtem und beschädigtem Gewebe sein.

#### 4.1.2.2 Biogenese des Pyrrolylcysteinsulfoxides

Bei der hier neu isolierten Substanz handelt es sich um ein bisher nicht beschriebenes Cysteinsulfoxid. Daneben kommt in Arten des Subgenus *Melanocrommyum* hauptsächlich Methiin, sowie in einigen Arten geringe Mengen Isoalliin vor [Jedelská 2007]. Die Biosynthese der Cysteinsulfoxide ist in diesen Arten also möglich, d.h. alle hierfür erforderlichen Vorläufer und Enzyme sind vorhanden. Aufgrund der geringen Substratspezifität der beteiligten Enzyme ist damit eine analoge Biosynthese des neuen Pyrrolylcysteinsulfoxides auf den diskutierten Wegen sehr wahrscheinlich. Hieran muß eine Pyrrol-Vorläufersubstanz beteiligt sein, die an Glutathion addiert wird, bzw. die in der direkten Synthese mit Serin reagieren kann. Hierfür kommen unterschiedliche Substanzen in Frage und sollen daher im folgenden diskutiert werden.

#### 4.1.2.3 Porphobilinogen

Die wichtigsten pyrrolhaltigen Substanzen in der Pflanzenwelt und in der Natur allgemein sind die Polypyrrole. Hierzu gehören neben den Tetrapyrrolen wie Chlorophyll oder Häm auch die kettenförmigen Gallenfarbstoffe.

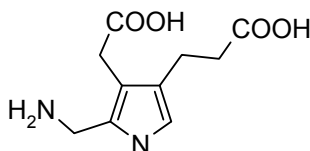


Abb. 4.5: Porphobilinogen, Vorläufersubstanz der Tetrapyrrole

Die Biosynthese dieser Porphyrine erfolgt aus Glycin und Acetat. Acetat wird hierbei zunächst in Acetyl-CoA umgewandelt, das in den Citronensäure-Zyklus eintritt. Dort wird es über Citrat in Succinyl-CoA ( $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-SCoA}$ ) umgewandelt.

Succinyl-CoA kondensiert in einem nächsten Schritt mit Glycin unter anschließender Decarboxylierung zu  $\gamma$ -Aminolävulinat (ALA;  $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-NH}_2$ ). Durch Verknüpfung zweier Moleküle ALA entsteht Porphobilinogen (PBG) (Abb. 4.5). PBG wiederum bildet die Grundstruktur des Porphyrinringes, wobei sich vier dieser Moleküle zusammenlagern [Lehninger 1987].

Jedoch kommt Porphobilinogen als Vorläufer für das Pyrrolylcysteinsulfoxid eher nicht in Frage. Hierzu müssten die Alkylcarboxylat- und die Alkylaminogruppe von dem Pyrrolgrundgerüst abgetrennt werden.

#### 4.1.2.4 Pyrrol-2-carboxylat

Weitere Beispiele für weit verbreitete, farbige Pyrrolverbindungen sind die Prodigiosine (Abb. 4.6). Diese roten Pigmente sind bereits seit Jahrhunderten bekannt und werden von einigen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien produziert [Fürstner 2003].

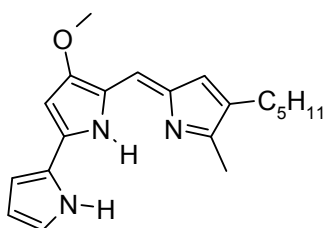


Abb. 4.6: Struktur von Prodigiosin

Die Biosynthese der Prodigiosine ist seit kurzem vollständig aufgeklärt [Williamson et al. 2006]. Diese ist von der Tetrapyrrol-Synthese über ALA vollständig losgelöst. Er stellt einen komplett neuen Mechanismus zur Bildung von Pyrrol dar. Die Biogenese erfolgt aus Prolin, Serin, Glycin und mehreren Acetat-Einheiten. In einer Teilreaktion wird das Prolin durch eine relativ komplexe Reaktion zu Pyrrol-2-carboxylat oxidiert. Hieran sind mehrere Enzyme beteiligt, die identifiziert werden konnten. Der erste Schritt dieser Reaktion ist die kovalente Bindung des Prolins an eine Peptyl-Carrier-Protein-Domäne, die an ein Protein gebunden ist. Nur Prolin, das an dieses Carrier-Protein gebunden ist, wird in der folgenden Reaktion umgesetzt. Hierdurch wird ein Gleichgewicht zwischen der umzuwandelnden Aminosäure und der nicht umgesetzten Aminosäure erreicht, so dass dem Organismus nicht die gesamte Menge Substrat entzogen wird. Ein großer Teil des Prolins bleibt somit dem primären Metabolismus erhalten und dient z.B. dem Aufbau von Proteinen. Für die Bindung an die

Bindungsdomäne erfolgt zunächst eine Aktivierung des Prolins. Dies geschieht durch Bindung an AMP übertragen aus ATP. Durch Ausbildung eines Thioesters aus der aktivierten Säuregruppe mit dem Carrier-Protein entsteht eine kovalente Bindung. Von den drei Pyrrolringen in Prodigiosin-Molekülen entsteht allerdings nur einer auf diese Weise. Für die Biosynthese der anderen Pyrrolringe sei hier auf Williamson et al. [2006] verwiesen.



Abb. 4.7: Biosynthese des Pyrrol-2-carboxylat aus Ornithin

Pyrrol-2-carboxylat ist aus mehreren Biosynthese-Mechanismen bekannt. Es tritt sowohl als freie Säure als auch metabolisiert auf. Zur weiteren Metabolisierung und der Einführung von anderen funktionellen Gruppen an den Pyrrol-Ring bleibt die kovalente Bindung zu dem Enzym bestehen. Die Ablösung von dem Carrier-Protein erfolgt nach der jeweiligen vollständigen Synthese. Diese Reaktion konnte bisher nur für einige Bakterien nachgewiesen werden. In Pflanzen ist ein solcher Prozess bisher nicht beschrieben worden.

Andrade et al. [1999] beschrieben die Bildung von Pyrrol-2-Carboxylat aus der nicht proteinogenen Aminosäure Ornithin (Abb. 4.7). Ornithin entsteht im Harnstoffcyclus unter Freisetzung von Harnstoff aus Arginin. Experimente mit radioaktiv markiertem Ornithin und Prolin an dem Meeresschwamm *Teichaxinella morchella* zur Bildung des Alkaloid Stevensin zeigten einen Einbau von beiden Substanzen in die Pyrrol-Einheiten. Der genaue Mechanismus ist hier allerdings nicht bekannt. Auch dieser Syntheseweg wurde bisher nicht für Pflanzen beschrieben.

Zur Biosynthese des vorliegenden Cysteinsulfoxides kämen beide Wege in Betracht.

#### 4.1.2.5 Mögliche Biosynthese

Der sich aus diesen Reaktionen ergebende mögliche Biosyntheseweg des S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides ist in Abbildung 4.8 wiedergegeben. Hierbei wurde der von Lancaster beschriebene Biosyntheseweg über die  $\gamma$ -Glutamylpeptide zugrunde gelegt. Die entsprechende Synthese direkt aus Aminosäuren erfolgt analog. Der erste Schritt ist hierbei die oben beschriebene Reaktion des Prolins oder Ornithins zum Pyrrol-2-carboxylat. Dieses bindet dann an die Thiolgruppe des Glutathions. Unter Abspaltung der Carboxysäuregruppe wird der aromatische Charakter des Pyrrols wieder hergestellt. Die weitere Reaktion erfolgt analog der Synthese der anderen Cysteinsulfoxide.

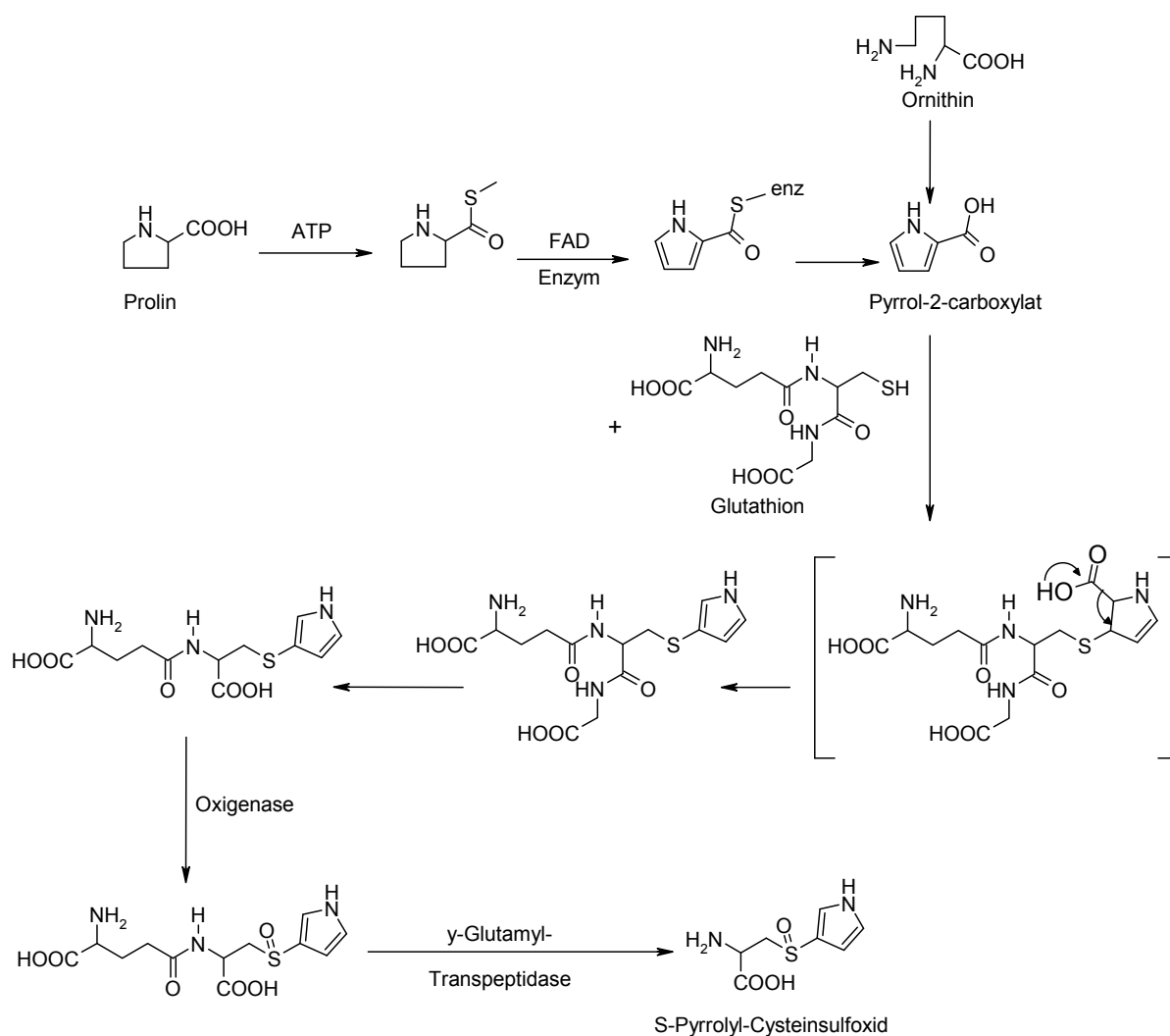


Abb. 4.8: Möglicher Biosyntheseweg des S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxides



Die Biosynthese muss in der Zukunft durch Experimente mit radioaktiv oder mit stabilen Isotopen (z.B.  $C^{13}$ ) markierten Ausgangssubstanzen überprüft werden. Weitere Aussagen können aus den bisherigen Ergebnissen nicht getroffen werden. Allerdings erscheint die Ausbildung eines Pyrrol-2-carboxylat als Zwischenstufe möglich. Da der Pyrrolring außer des Sulfoxidrestes unsubstituiert vorliegt, erscheint eine Synthese analog der Tetrapyrrolsynthese aus Acetat und Glycin über Porphobilinogen eher unwahrscheinlich.

## **4.2 Proteinanalytik**

Mit der Isolierung der stabilen Vorläufersubstanz konnte ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Biosynthese des roten Farbstoffes erreicht werden. Ebenso wichtig zum Verständnis dieser Vorgänge ist aber auch die Kenntnis der an diesem Prozess beteiligten Enzyme. Mindestens ein Enzym ist an dieser Reaktionskaskade beteiligt, das die Umwandlung des Cysteinsulfoxides katalysiert. Genauere Kenntnisse über dessen Aufbau und Eigenschaften sind nötig um neue Erkenntnisse zu erlangen.

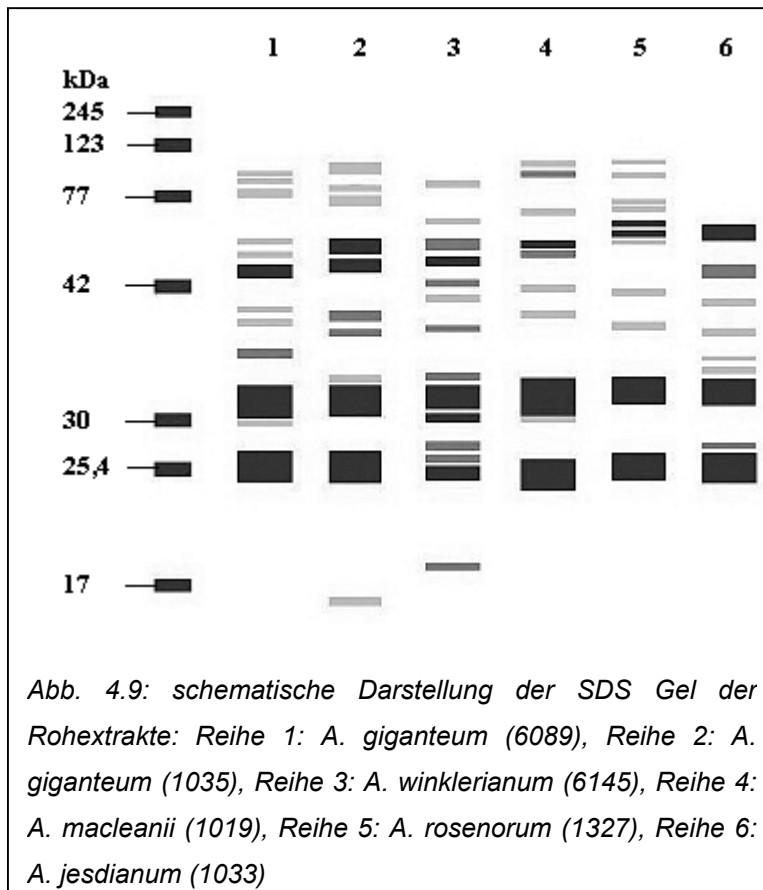
### **4.2.1 Ausbeuten der Proteinrohextrakte**

Die Proteinrohextrakte wurden zunächst auf ihren Gesamtproteingehalt untersucht und die Proteinausbeuten bezogen auf das Frischgewicht der Zwiebel berechnet. Die Bestimmung erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden, nach Lowry und nach Bradford.

Die Ausbeuten der Bestimmung nach Bradford waren in der Regel niedriger als die Werte nach Lowry. Eine Erklärung hierfür sind die unterschiedlichen Prinzipien der Methoden. Bei der Methode nach Lowry handelt es sich um eine Redoxreaktion, bei der zunächst in alkalischer Lösung ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet wird. Dieser reduziert anschließend zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Phenol-Reagenz), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Menge der vorhandenen Proteine intensiv blau verfärbt. In diesem Reaktionsschritt werden die Proteine denaturiert. Die Absorption der Lösungen wird bei 540 nm gemessen [Lowry et al. 1951]. Bei der Bradford-Methode reagiert das Farbstoff-Anion des Coomassie Brilliant Blue G250 mit protonierten Aminogruppen des Proteins (z.B. in Arginin) zu einem blauen Farbstoffkomplex. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums durch diese Anlagerung wird bei 595 nm gemessen und ist direkt proportional zum Proteingehalt [Bradford 1976]. Diese Methode ist also wesentlich abhängiger von der Primärstruktur der in Lösung befindlichen Proteine. Ein Grund für die hohen Abweichungen der beiden Bestimmungsmethoden könnte in der vermutlich hohen Konzentration an Glykoproteinen in den Extrakten liegen. Eines der wichtigsten Proteine in *Allium*-Arten ist das Enzym Alliinase (beschrieben in Kapitel 1.3.2), ein Glykoprotein. Auch bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Protein handelte es sich vermutlich um ein Glykoprotein (vgl. Kapitel 3.3). Die Zuckerreste in der Seitenkette schirmen die Oberfläche der Proteine sterisch ab, so daß eine Anlagerung des

Coomassie-Farbstoffes im Vergleich zu anderen Proteinen (wie BSA, das als Standard verwendet wurde) erschwert ist. Bei der Methode nach Lowry dagegen ist dieser Effekt durch den ersten oxidativen Schritt nicht von Bedeutung.

#### 4.2.2 Proteingelanalytik



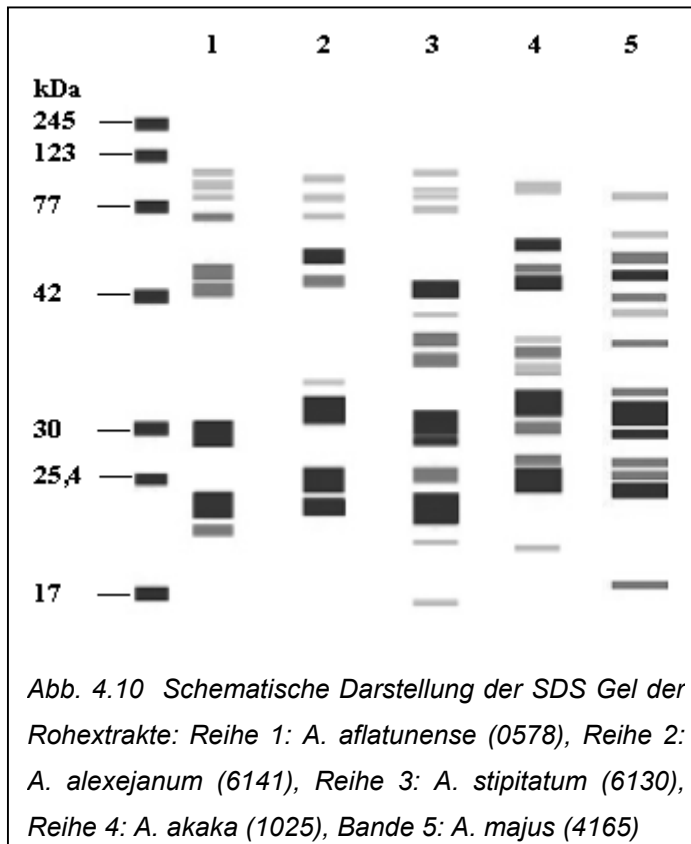
Die Proteinrohextrakte wurden weiterhin mittels SDS- Gelelektrophorese untersucht. Hierbei wurden die Proteine denaturiert und das Muster der Unter-einheiten miteinander verglichen.

In den Abbildungen 4.9 und 4.10 sind die Proteinbanden einiger Arten schematisch dargestellt. Der charakteristische Bereich für die Arten des Subgenus

*Melanocrommyum* sind

die zwei intensiven und breiten Banden zwischen 23 und 32 kDa. Die zum Teil sehr extreme Verbreiterung könnte auf ein Glykoprotein in diesem Bereich hindeuten. Einige Glykoproteine sorgen bei SDS Gelen für Bandenverbreiterung, da es zu einer Art Gleichgewicht zwischen Resten mit und ohne den Zuckerrest kommt. Auch kann hier die Länge des Zuckerrestes durch den Denaturierungsprozess unterschiedlich sein. Dadurch ergeben sich leicht unterschiedliche Molekülgrößen, deren Banden ineinander fließen, da die Trennung so kleiner Größenunterschiede unter diesen Bedingungen nicht möglich ist. Besonders interessant sind hierbei die Proteinbanden von *A. giganteum* aus Usbekistan (Bande 1) und von *A. winklerianum* (Bande 3). In diesen beiden Arten sind die Hauptbanden sehr viel schwächer als in anderen Arten und die Banden im Vergleich sehr schmal. Es ist möglich, dass hier das Glykoprotein

modifiziert vorliegt und der Zuckerrest nicht mehr vorhanden ist. Eine weitere Möglichkeit ist eine Abspaltung des Zuckerrestes im Laufe der Verarbeitung der Proben.



Die auffälligste Region in den Proben des Subgenus *Melanocrommyum* ist also der Bereich zwischen 23 und 32 kDa. Die intensiven Banden in diesem Bereich sind bisher nur in Arten dieses Subgenus nachgewiesen worden und sind charakteristisch. Möglicherweise sind die Proteine dieser Region an der Reaktion zur Bildung des roten Farbstoffes beteiligt, da auch diese Reaktion spezifisch für Arten des Subgenus *Melanocrommyum* ist. Auffällig ist hier, dass auch Arten, die

keinen roten Farbstoff ausbilden, wie z.B. *A. stipitatum* oder *A. aflatumense*, diese breiten intensiven Proteinbanden aufweisen. In diesen Arten könnte das Enzym durch mögliche strukturelle Unterschiede inaktiviert vorliegen oder das L-(+)-S-(3-pyrrolyl)Cysteinsulfoxid als Vorläufer ist nicht vorhanden (vgl. Kapitel 4.5).

Während der Verarbeitung verschiedener Proben wurde deutlich, dass erhebliche Unterschiede in den Proteingelmustern innerhalb einzelner Arten auftraten. Am Beispiel von *A. giganteum* sind die Banden von drei Proben von verschiedenen Standorten in Tabelle 4.1 wiedergegeben. Zusätzlich wurde eine Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Ernte aufgearbeitet. Dabei trat ein Phänomen auf, das auch in einigen anderen Fällen beobachtet werden konnte. Die nur kurz gelagerte Probe verfärbte sich nicht, wie bei der Aufarbeitung üblich, orange-rot. Die später aufgearbeitete Probe zeigte dagegen das typische Verhalten. Aus der Tabelle 4.1 sind die Unterschiede in den Proteinen zwischen den Proben ersichtlich.

Banden SDS-Gel	<i>A. giganteum</i>			
Molekulargewicht kDa	1035, farblos	1035, rot	6089	4165
80 bis 40	55 m   42 m	50 w  43 m	55 w  50 w  42 m	42 w  40 m
39 bis 30	40-35  mehrere Banden w	40-35  mehrere Banden w	40-35  mehrere Banden w	40-30  mehrere Banden w
29 bis 20	28 s    21 s	28 s    21 s	28 s    21 s	29 s 28 w 24 w 23 w 22 s
19 bis 10	18 w	/	/	15 w

Tab. 4.1: Proteinbanden im SDS Gel verschiedener *A. giganteum* Proben; die beiden 1035er Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Ernte aufgearbeitet, die Extrakte verhielten sich unterschiedlich (der Extrakt aus der länger gelagerten Zwiebel verfärbte sich rot-orange, der jüngere Extrakt blieb farblos) und zeigen auch Unterschiede im Proteinmuster, (w: schwache Bande, m: mittlere Bande, s: starke Bande)

Für diese großen Unterschiede innerhalb einer Gattung und sogar innerhalb einer Probe gab es verschiedene Gründe. Die Unterschiede in einer Varietät an verschiedenen Standorten waren mit den unterschiedlichen klimatischen und geologischen Gegebenheiten zu erklären. Die unterschiedlichen Lebensbedingungen

der Pflanzen zwangen diese zu unterschiedlichen Anpassungen an ihre Umgebung. Die erste Probe (Probe 1035) wurde im Binalud Massiv im Iran auf einer Höhe von 1750m gesammelt. Der Standort war sonnenexponiert auf Felsterrassen oder Kalkstein-Geröllabhängen. Die Probe aus Tadschikistan (Probe 6089) wurde dagegen auf einer Höhe von nur knapp über 1000m an einem sonnenbeschienenen Hang auf einem ärmeren Boden gesammelt. Die verwendeten Proben wuchsen also unter unterschiedlichen klimatischen (Sonne, Regen, Temperaturen) wie auch geologischen (Bodenbeschaffenheit, Nährstoffe) Bedingungen. Hierdurch wurden unterschiedliche Herausforderungen an die Protein-Biosyntheseleistungen der Pflanze gestellt. Damit ergab sich auch eine unterschiedliche, an die Situation angepasste, Proteinexpression mit der sich die Unterschiede erklären lassen.

Im allgemeinen ist für die Zusammensetzung und den Gesamtgehalt an Proteinen vor allem die Verfügbarkeit von Stickstoff von Bedeutung. Die Auswirkungen von äußeren Einflüssen auf Proteine und andere Faktoren wurden intensiv an Getreide, besonders Weizen, als wichtige Kulturpflanzen untersucht. Hier ist der Gehalt und die Zusammensetzung besonders bedeutsam für den Wert und die Weiterverarbeitung.

Die Proteinzusammensetzung von Getreidearten hängt hauptsächlich vom Genotyp ab, wird aber auch von Umwelteinflüssen beeinflusst [Graybosch et al. 1996, Huebner et al. 1997, Triboï et al. 2000, Zhu und Khan 2001]. Die Mechanismen, mit denen diese beiden Faktoren die Proteine beeinflussen, sind dagegen unbekannt [Martre et al. 2003]. Experimente unter kontrollierten Bedingungen zeigten einen Einfluss des Wetters auf den Gesamtproteingehalt und die Proteinzusammensetzung [Porter und Semenov 2005].

Hohe Temperaturen während des Getreidewachstums führen zu erhöhten Proteingehalten. Die Ergebnisse zur Auswirkung von Regen sind nicht so eindeutig. Erhöhte Regenmengen scheinen aber zu höheren Proteingehalten zu führen. Während der linearen Wachstumsphase scheint Stress durch Trockenheit einen linearen Effekt auf den Proteingehalt zu haben [Gooding et al. 2003]. Allgemein ist aber die Auswirkung von äußeren Einflüssen von der Entwicklungsphase der Pflanze abhängig [Daniel und Triboï 2002]. Entscheidend für den Proteingehalt ist allerdings der zur Verfügung stehende Stickstoff [Jamison und Semenov 2000].

Äußere Faktoren können bei Pflanzen Stress-Reaktionen auslösen. Dazu gehören Hitze, Kälte, hohe Salzgehalte, zu viel oder zu wenig Wasser. Hierdurch können sekundäre Faktoren ausgelöst werden, wie oxidativer oder osmotischer Stress. Alle

diese Stressfaktoren führen zu einer Aktivierung von Genen, die den negativen Auswirkungen entgegenwirken. Zu den Verteidigungsmechanismen der Pflanze gehört auch die Produktion von Proteinen oder Enzymen, wie Hitzeschockproteinen (HSP) oder antioxidativen Enzymen [Wang et al. 2003].

Des weiteren schwankt die Zusammensetzung der Proteine stark in Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium der Pflanze. Unterschiedliche Erntezeitpunkte haben also auch eine Auswirkung auf die Proteinzusammensetzung. So werden Speicherproteine in Samen und unterirdischen Speicherorganen eingelagert, wenn eine große Menge an Stickstoff vorhanden ist. In Mangelzeiten oder bei erhöhtem Verbrauch (durch Wachstum, Blütephase o.ä.) können diese Speicherproteine mobilisiert und zum Aufbau anderer Proteine verwendet werden [Heldt 2004]. Ein Speicherorgan wie die *Allium*-Zwiebel wird im Pflanzenwachstum und zum Zeitpunkt der beginnenden Blüte relativ wenig Gesamtprotein und wenig Speicherprotein enthalten, da diese Reserven für Wachstum und Blüte verwendet werden. Zum Beginn der Ruhezeit und kurz davor ist dagegen viel Protein eingelagert. Die Pflanze beginnt in Vorbereitung auf den Winter mit der Speicherung von Nährstoffen. Neben den klimatischen und geologischen Bedingungen ist also auch der Erntezeitpunkt von entscheidender Bedeutung. Pflanzen entwickeln sich abhängig von den Bedingungen an ihrem Standpunkt unterschiedlich schnell (Sonneneinfall, Temperatur, Höhenmeter, Nährstoffversorgung). Daher können sich auch Proben, die an aufeinander folgenden Tagen geerntet wurden, in ihrem Entwicklungsstadium signifikant unterscheiden.

Die Unterschiede innerhalb einer Probe sind dagegen schwieriger zu erklären. Durch die gleichen klimatischen und geologischen Voraussetzungen und den gleichen Sammelzeitpunkt sollte das Proteinmuster und das Verhalten bei der Verarbeitung ähnlich sein. Die Unterschiede sind vermutlich durch die kurze Lagerzeit der ersten Aufarbeitung bedingt. Durch lange Lagerung kann es zu einer Umwandlung oder zu einem Abbau einzelner Proteine kommen. Eine weitere mögliche Erklärung für die Unterschiede ist in der Sammlung begründet. In der Ansammlung von *A. giganteum* Pflanzen könnten einige vereinzelte Pflanzen einer verwandten Art enthalten sein. Diese würden bei der Sammlung, abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanzen, nicht unbedingt auffallen.

Tabelle 4.2 enthält einen Vergleich der Proteinmuster verschiedener Proben der Spezies *A. rosenorum*. Alle wurden in der Lebendpflanzenkollektion des IPK Gatersleben nachgezogen, die hierzu verwendeten Zwiebeln stammten ursprünglich dagegen von unterschiedlichen Standorten. Die erste Probe stammte von einem niederländischen Blumenzwiebelexperteur, während die anderen drei Proben an verschiedenen Standorten in Tadschikistan gesammelt wurden. Aus der tabellarischen Zusammenfassung sind deutliche Unterschiede zu erkennen.

Banden SDS-Gel	<i>A. rosenorum</i>			
Molekulargewicht kDa	3781	1869	1894	1327
80 bis 40	60 w  55 m	60 s  55w	60 m  55 w 53 w	60 m  57 w
39 bis 30	40-35  mehrere Banden w  32 s	40-35  mehrere Banden w  32 s	40-35  mehrere Banden w  31 s	40-35  mehrere Banden w  33 s
29 bis 20	25 s	27 w 25 s	25 s	26 s
19 bis 10	18 w	18 w	/	/

Tab. 4.2: Proteinbanden im SDS Gel verschiedener *A. rosenorum* Proben

Die Proteinmuster verschiedener Proben der Spezies *A. jesdianum* sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Diese Proben gehörten zusätzlich zu unterschiedlichen Unterarten. Die erste Probe gehörte zur Subspezies *angustipedale*, der Originalstandort befand sich im Iran. Sie wurde wie auch die *A. giganteum* Probe (1035) im Binalud Massiv gesammelt, in einer Höhe von 1700 m auf einem sonnenexponierten Hang in tiefem Geröll im Schatten unter Kalksteinfelsen. Die anderen Proben gehörten zur Subspezies



*A. jesdianum* Boiss et Buhse und waren, wie die *A. rosenorum* Proben, Nachzuchten aus Gatersleben. Proben 2 und 3 stammten ursprünglich von unterschiedlichen Standorten in Usbekistan, die vierte Probe von einem unbekannten Standort in Afghanistan und wurde vom Botanischen Garten Göteborg bezogen.

Die Unterschiede der ersten *A. jesdianum* Probe zu den anderen ist zum einen mit den oben diskutierten Unterschieden in den klimatischen und geologischen Gegebenheiten zu erklären. Zum anderen handelt es sich hierbei um eine andere Subspezies, was weitere Abweichungen erklärt.

Banden SDS-Gel	<i>A. jesdianum</i>			
Molekulargewicht kDa	1033	3671	3666	1082
80 bis 40	55 m 53 w 50 m	60 m 55 m	60 m 55 w 53 m 44 w	60 w 55 s 44 w
39 bis 30	40-35 mehrere Banden w 33 w 32 s	40-35 mehrere Banden w 32 s	40-35 mehrere Banden w 32 s	40-35 mehrere Banden w 32 s
29 bis 20	27 w 25 s	25 s	27 w 25 s	27 w 25 s
19 bis 10	/	18 w	/	18 w

Tab. 4.3: Proteinbanden im SDS Gel verschiedener *A. jesdianum* Proben

Beim Vergleich der Arten, die in Gatersleben nachgezogen wurden, fielen allerdings ebenfalls einige kleinere Unterschiede auf. Diese könnten mit der unterschiedlichen Herkunft der Proben erklärt werden. Aufgrund der Bedingungen an den Ursprungsstandorten könnten sich Unterarten herausgebildet haben. Durch die klimatischen und geologischen Gegebenheiten in den einzelnen Ländern und die Größe und Abgeschiedenheit der Regionen ist die Entwicklung von regional abgegrenzten Unterarten möglich. Diese Varietäten lassen sich dann am ehesten nach ihrem Ursprungsland oder ihrer Ursprungsregion unterteilen.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass die meisten Arten des Subgenus *Melanocrommyum* durch ihr Proteinmuster von anderen Untergattungen eindeutig unterschieden werden können. Die starken Proteinbanden im SDS-Gel zwischen 23 und 32 kDa konnten bisher in keiner Art einer anderen Untergattung nachgewiesen werden. Rückschlüsse von den Proteingelen auf die Spezies scheinen allerdings nicht möglich. Die Schwankungen in der Zusammensetzung sind zwischen den einzelnen Proben größer als zwischen den Spezies.

#### **4.2.3 Proteinaufreinigung**

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung des an der Bildung des Farbstoffes beteiligten Enzyms. Es wurden zwei Isolierungsprotokolle entwickelt, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Als Ausgangssubstanzen dienten Rohproteinextrakte der Spezies *A. macleanii*. Für Proben beider Aufreinigungen konnte die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt werden. Zur Vereinfachung werden die beiden Proteine im folgenden Proteinfraktion A und B genannt.

##### **4.2.3.1 Aufreinigung von Proteinfraktion A**

Proteinfraktion A wurde nach der Gelchromatographie mit einer Affinitätschromatographie an einer Con A Lektin-Säule aufgereinigt. Zur näheren Charakterisierung konnte das aus dem *A. macleanii* Rohextrakt isolierte Protein N-terminal sequenziert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass in der Probe Con A aus dem Säulenmaterial enthalten war. Da die Probe enzymatische Aktivität aufwies, waren neben Con A auch geringe Mengen des Enzyms enthalten. Eine Abtrennung der

beiden Proteine war nicht möglich. Daher wurde eine neue Aufreinigungsmethode entwickelt.

#### 4.2.3.2 Aufreinigung von Proteinfraktion B

Proteinfraktion B wurde nach der Gelchromatographie mit zwei Affinitätschromatographiemethoden aufgereinigt. Hierzu wurde wieder eine Lektin-Affinitätschromatographie eingesetzt, hier mit dem Lektin aus *Lens culinaris* (Linse). Dieses Lektin bindet ebenfalls spezifisch an Mannose- und Glucosereste, allerdings weniger stark als Con A. Da die Bindung des gesuchten Enzyms an Con A sehr fest war, sollte eine Ablösung von diesem Lektin leichter sein. Tatsächlich konnten geringere Methylmannose-Konzentrationen verwendet werden. Ein weiterer Aufreinigungsschritt wurde an einer Nickelsäule durchgeführt. An der Oberfläche liegende Histidin-Seitenketten konnten an das Nickel binden und später durch eine Erniedrigung des pH-Wertes abgelöst werden.

Das isolierte Enzym besteht aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 25 und 31 kDa. Nach den Ergebnissen der Gelchromatographie beträgt das Molekulargewicht des nativen Enzyms 110 bis 120 kDa. Das Enzym besteht daher vermutlich aus vier Untereinheiten, zwei mit einem Molekulargewicht von 25 kDa und zwei mit 31 kDa. Das Enzym zeigte neben der Katalyse der Bildung des roten Farbstoffes als eine Alliinase-ähnliche Reaktion auch eine Polyphenoloxidase-Aktivität. Es war unklar, welche der Untereinheiten für diese unterschiedlichen Aktivitäten verantwortlich sind. Eine Verunreinigung der Probe durch das als Säulenmaterial verwendete *Lens culinaris*-Lektin konnte ausgeschlossen werden. Blindversuche zeigten, dass das Säulenmaterial unter den verwendeten Bedingungen stabil war. Hierzu wurde eine neue Säule mit Phosphatpuffer und anschließend mit Mannosepuffer gespült und das Eluat fraktioniert aufgefangen. Die Untersuchung der aufkonzentrierten Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE. Das Lektin von *Lens culinaris* besteht aus Untereinheiten in einer Größe von 17,5 kDa und 5,7 kDa, die im Elektrophoresegel nicht nachgewiesen werden konnten.

Die N-terminale Aminosäuresequenz wurde von CSL Behring bestimmt. Die ermittelte Sequenz lautet:

GLEQT(F+Y)-TLLIKENIGD(L+V)N(Q+K)AD(I+V)YNPNSGGITTLN(S/N)QKLPII(I)Y

Ein Abgleich der Sequenz mit einer Protein Datenbank (UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot + TrEMBL)) zeigte keine Übereinstimmungen mit einem bekannten Enzym. Die besten Übereinstimmungen ergaben sich mit einigen Speicherproteinen, wie Glutelin, Legumin oder Globulin aus verschiedenen Pflanzen. Die Sequenz-Übereinstimmung betrug ca. 50% bis 60% oder weniger. Die meisten Übereinstimmungen bestanden mit 11S Globulinen, zu denen die meisten Speicherproteine gehören.

Schon 1924 klassifizierte Osborne die Proteine von Pflanzen anhand ihrer Löslichkeitseigenschaften in vier Gruppen. Er unterschied zwischen Albuminen (löslich in Wasser), Globulinen (löslich in verdünnten Salzlösungen), Glutelinen (löslich in verdünnten Alkalilösungen und Säure) und Prolaminen (löslich in wässrigem Ethanol). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit werden die Gluteline heute zu den Prolaminen gezählt [Heldt 2004].

Die Stabilität von Speicherproteinen auch gegen Proteasen beruht auf der quartären Struktur dieser Proteine. Alle von Proteasen angreifbaren Stellen befinden sich durch die Proteinfaltung im Inneren der Struktur und sind somit abgeschirmt [Heldt 2004]. Außerdem bilden sich zum Schutz spezielle Membran-gebundene Organellen aus. Die Einlagerung in diese so genannten Protein-bodies schützt die Speicherproteine vor Abbaureaktionen, bis sie benötigt werden [Müntz 1998].

Globuline sind eine Gruppe von sehr weit verbreiteten Proteinen. Ihr Name leitet sich von ihrer kugeligen Gestalt ab. Sie enthalten hauptsächlich L-Leucin, Glutaminsäure, Glycin, L-Lysin, L-Arginin und L-Tyrosin [Römpp 2008, Belitz et al. 2008]. Die Globuline von Getreidearten haben abhängig von der Getreideart einen unterschiedlichen Anteil an Mehlproteinen, zwischen 2,8% im Mais und 11,9% im Hafer. Eine große Bedeutung haben auch Viciline und Legumine der Leguminosearten. Diese können 60% (Saubohne) bis 90% (Sojabohne) des Gesamtproteins ausmachen. Legumin ist ein Speicherprotein aus Leguminosensamen mit einem Molekulargewicht von 300 kDa bis 400 kDa [Heldt 2004]. Die sechs Untereinheiten des Proteins sind wiederum in jeweils zwei Untereinheiten unterteilt, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind [Lexikon der Biochemie 2008]. Der Name Vicilin leitet sich von der Wicke (*Vicia sativa*) ab. Es ist auch in Linsen, Bohnen und Erbsen enthalten [Römpp 2008, Belitz et al. 2008]. Die Aminosäuresequenz ist sehr ähnlich dem Legumin, Vicilin ist allerdings ein Trimer und die Untereinheiten bestehen aus nur einer Peptidkette. Im Gegensatz zum Legumin liegt Vicilin häufig glykosyliert vor [Heldt 2004].

Gluteline und Prolamine sind typische Getreideproteine und kommen nur in Gräsern vor. Sie haben einen hohen Glutaminsäure- (bis 45%) und Prolingehalt. Beispiele für Gluteline sind Glutein (Weizen) und Orycenin (Reis), für Polamine Gliadin, Hordenin und Zein [Lexikon der Biochemie 2008]. Gluteline sind reich an Lysin und Tryptophan [Lexikon der Biologie 2008].

Einige Speicherproteine weisen auch noch andere, pflanzenprotektive Eigenschaften auf. So bindet Vicilin an das Chitin von Pilzen und Insekten. In einigen Insekten behindert es die Entwicklung der Larven. Weiterhin kommen auch Proteinase- und Amylase-Inhibitoren vor. Diese verhindern die Verdauung von Proteinen und Stärke im Verdauungssystem. Außerdem konnten eine Vielzahl von Lektinen nachgewiesen werden. Werden diese von Tieren aufgenommen, können sie an Glykoproteine im Intestinaltrakt binden und damit die Aufnahme von Nährstoffen behindern [Heldt 2004].

Die in Sojabohnensamen hauptsächlich vorkommenden Speicherproteine sind Glycinin und  $\beta$ -Conglycinin. Die Proteinfaltung dieser beiden Proteine findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Hilfe von Chaperonen und Foldasen statt. Die beiden Proteinklassen werden allgemein für die Proteinfaltung verantwortlich gemacht. Chaperone sind Proteine, die an neu gebildete Polypeptide binden, bevor diese komplett gefaltet sind. Sie verhindern die Entstehung von nicht korrekten Zwischenstufen. Außerdem können sie an noch nicht zusammenhängende Proteinuntereinheiten binden und diese vor Präzipitation durch falsche Aggregation schützen. Sie unterstützen damit die Bildung von funktionsfähigen Proteinen aus mehreren Untereinheiten. Viele Chaperone sind Hitzeschockproteine, die bei Stress durch erhöhte Temperaturen gebildet werden. Sie dienen damit auch der Regenerierung von durch Hitze geschädigten Proteinen [Horton et al. 2002]. Foldasen werden in zwei Gruppen unterteilt, die isoliert und charakterisiert werden konnten: Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) und Peptidyl-Prolyl cis-trans-Isomerasen (PPI) [Ellis 1993]. PDI katalysieren die Bildung von Disulfidbrücken in sich bildenden Peptidketten. Vor kurzem konnte die Assoziation von einigen PDI aus Sojasamen an Proglycerin nachgewiesen werden. Diese nicht kovalente Assoziation konnte durch die Zugabe von verschiedenen Substanzen, wie z.B. Dithiothreitol, gesteigert werden. Da dieses die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert, könnte diese Steigerung mit der Akkumulation von nicht gefaltetem Proglycerin im ER erklärt werden [Kamauchi et al. 2008, Wadahama et al. 2007, 2008]. Das Proglicinin Protomer besitzt zwei Disulfid Bindungen. Das fertige Glycinin braucht beide Disulfidbindungen für seine Stabilität. Einige PDI Enzyme wirken auch als Chaperone und falten z.B. Conglycinin, welches

keine Disulfidbrücken aufweist [Kamauchi et al. 2008, Wadahama et al. 2007, 2008]. Auch ein Komplex verschiedener PDI mit Calnexin oder Calreticulin konnte nachgewiesen werden. Diese Lektine im ER sind an der Faltung von Glykoproteinen beteiligt. Die Faltungsrate kann durch die Komplexierung mit PDI gesteigert werden [Wadahama et al. 2007].

Die meisten Speicherproteine sind in Samen enthalten und bilden damit eine eigene Proteingruppe. Es konnten allerdings auch Speicherproteine außerhalb von Samen; aus vegetativen Organen nachgewiesen werden, wie aus der Knolle der Süsskartoffel *Ipomea batata* (L.) Poir ex Lam [Shewry 2003, Yeh 1997], der Kartoffel *Solanum tuberosum* L. [Müntz 1998, Racusen und Foote 1980], im Parenchym des Stammes von Pappel *Populus* sp [Langheinrich und Tischner 1991, Langheinrich 1993, Davis et al. 1993, van Cleve und Apel 1993] und Weide *Salix* sp [Sauter et al. 1988] und in Sprösslingen des Pfirsichbaumes (*Prunus persica* L. Batsch) [Gomez und Faurobert 2002], wie auch in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [Dhont et al. 2006, Justes et al. 2002, Cunningham und Volenec 1996] und der Sojabohne (*Glycine Max*) [Staswick 1988]. Dies ist nur ein kleiner Teil der bis heute beschriebenen Speicherproteine. Sie zeigen eine große Ähnlichkeit in der Aminosäure-Zusammensetzung zu den Samenproteinen, können aber diesen nicht zugeordnet werden und gehören vermutlich nicht zur gleichen Familie. Diese Proteine werden als vegetative Speicherproteine (VSP) bezeichnet. Auch sie werden in Membran gebundenen Protein-bodies gespeichert. Interessanterweise zeigen einige VSP enzymatische Aktivität [Müntz 1998].

Wohl am besten untersucht sind die VSP aus den Blättern der Sojabohne. Es konnten 27 kDa, 29 kDa und 94 kDa große Proteine isoliert werden. Die beiden kleineren Proteine zeigen eine saure Phosphatase-Aktivität [De Wald et al. 1992], das größere Protein Lipxygenase-Aktivität [Tranbarger et al. 1991]. Auch in *Arabidopsis thaliana* konnte ein VSP nachgewiesen werden, das eine saure Phosphatase-Aktivität aufweist und gleichzeitig anti-insektizid wirkt [Liu et al. 2005].

Patatin ist ein ca. 40 kDa großes, glykosyliertes Protein aus der Knolle der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), das eine Acyl-Hydrolase-Aktivität aufweist [Andrews et al. 1988, Anderson et al. 2002]. Im besonderen zeigt Patatin Phospholipase-Aktivität an Phospholipiden und Lysophospholipid-Substraten [Senda et al. 1996, Hirschberg et al. 2001] und Esterase-Aktivität [Rosahl et al. 1987]. Außerdem ist eine saure  $\beta$ -1,3-Glucanase-Aktivität beschrieben worden [Tonón et al. 2001]. Es wird vermutet, dass

Patatin eine wichtige Rolle bei der Verteidigung vor potentiellen Pathogenen spielt. Das vegetative Speicherprotein der Süßkartoffel (*Ipomea batata*) ist Sporamin. Es können zwei große Sporamin Familien unterschieden werden. Sporamin A hat ein Molekulargewicht von 31 kDa, Sporamin B von 22 kDa [Shewry 2003]. Sporamin wirkt als Trypsin Inhibitor [Yeh et al. 1997]. Ausserdem verfügt es über Dehydroascorbat-Reduktase und Monohydroascorbat-Reduktase-Aktivität [Hou und Lin 1997] und damit antioxidative Eigenschaften. Die VSP von Knollenlieferanten neben der Kartoffel und der Süßkartoffel wurden von Shewry [2003] in einem Review zusammengefasst.

Auch in Baumarten konnten einige Speicherproteine nachgewiesen werden. So wurde aus der Pappel ein 32 kDa großes VSP isoliert. Im Gegensatz zur Sojabohne dient dieses Protein ausschließlich der Stickstoffspeicherung, und hat keine andere biologische Aktivität [Stepien und Martin 1992, Stepien et al. 1994]. Aus einem immergrünen Baum, *Litchi chinensis*, gelang 2007 die Isolierung eines 22 kDa großen VSP, das als Trypsin Inhibitor fungiert [Tian et al. 2007].

Zusammenfassend kann über die vegetativen Speicherproteine gesagt werden, dass sie eine sehr große, inhomogene Gruppe bilden. Im Gegensatz zu den Samen-Proteinen sind sie nicht eng miteinander verwandt, sondern zeigen sehr unterschiedliche Eigenschaften. Neben der Speicherfunktion für Stickstoff scheinen viele dieser Proteine ein Teil der Selbstverteidigungsmechanismen der Pflanze zu sein. Eine enzymatische Aktivität ist im Gegensatz zu den Samen-Speicherproteinen nicht ungewöhnlich und wird in vielen Fällen beobachtet.

Die Ergebnisse lassen zwei mögliche Schlussfolgerungen zu. Zum einen könnte das Enzym an ein Lagerprotein gebunden sein. Da bei der N-terminalen Sequenzierung nur ein kleiner Teil des Proteins untersucht wurde, könnte nur der inaktive, der Speicherung dienende, Teil erfasst worden sein.

Für Alliinase aus Knoblauch wurde eine Kopplung an Lektine nachgewiesen. Diese können auch als eine besondere Form der Speicherproteine aufgefasst werden. Die Zuckerseitenkette der Alliinase bindet hierbei an spezielle Mannose-bindende Lektine (ASA). Von den beiden wichtigsten Lektinen aus Knoblauch bindet vor allem ASA I an die Alliinase, ASA II nur in geringerer Menge [Rabinkov et al. 1995]. Auch im Nektar des Lauches konnte eine Alliinase-Lektin-Bindung bestätigt werden [Peumans et al. 1997]. Des weiteren konnten solche Glykoenzym-Lektin-Komplexe in anderen Pflanzenarten, besonders Leguminosen nachgewiesen werden [Gansera et al. 1979, Bowles und Marcus 1981]. Die Ergebnisse der Sequenzierung ließen aber auf keine

Ähnlichkeit der Sequenz mit bekannten Lektinen schließen. Daher ist eine Lektin-Enzym Bindung in diesem Fall eher unwahrscheinlich.

Möglich ist auch eine Bindung zwischen Enzym und Speicherprotein, wie sie zwischen Protein-Disulfid-Isomerasen und Speicherproteinen z.B. in Sojasamen vorkommt. In diesem Fall ist die Bindung allerdings relativ schwach und bleibt in der Regel auch nur für kurze Zeit bestehen. Im vorliegenden Protein müsste dagegen eine relativ stabile, vermutlich kovalente Bindung vorliegen.

Zum anderen könnte es sich um ein vegetatives Speicherprotein mit einer enzymatischen Aktivität handeln, wie es bereits für viele andere VSP beschrieben wurde. Da die Zwiebeln der *Allium*-Arten vegetative Speicherorgane sind, ist ein Vorhandensein von VSP in diesen Zwiebeln sehr wahrscheinlich, auch wenn ein Nachweis bislang aussteht.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass beide Formen von Speicherproteinen mit den Selbstverteidigungsmechanismen der Pflanze in Verbindung gebracht wurden. Auch die Bildung des roten Farbstoffes könnte als Strategie zur Verteidigung angesehen werden (vgl. Kapitel 4.3).

Zur weiteren Charakterisierung und Einordnung des Enzyms müssen mehr Informationen über die Sequenz des Enzyms erlangt werden. Hierzu bietet sich ein teilweiser Verdau des Proteins mit Trypsin, gefolgt von einer Trennung der Bruchstücke und deren N-terminaler Sequenzierung an.

#### **4.2.4 Kinetische Parameter der Proteinfraction B**

Zur weiteren Charakterisierung des isolierten Enzyms B wurden die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  sowie die Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur untersucht. Hierzu sollte sowohl die Alliinase-ähnliche Aktivität als auch die Polyphenoloxidase-Aktivität näher untersucht werden. Als Summenparameter für die gesamte Reaktion der Farbstoffbildung wurden zusätzlich die Parameter für die Bildung des Farbstoffes bestimmt.



#### 4.2.4.1 Charakterisierung der Alliinase-ähnlichen Aktivität

Die Ergebnisse der Bestimmung der kinetischen Parameter für die Alliinase-ähnliche Aktivität sind in Kapitel 3.4.1 aufgeführt. Die pH- und Temperatur-Optima sowie die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte sind noch einmal in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

pH	rel. Aktivität [%]	Standardabweichung
5,0	72,30	5,43
7,5	78,28	6,17

Temperatur [°C]	rel. Aktivität [%]	Standardabweichung
20,0	70,62	3,88
22,5	71,03	3,63
36,0	100,00	11,46

	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]
<b>Lineweaver-Burk</b>	$2,80 \cdot 10^{-5}$	93,40
<b>Hanes</b>	$2,42 \cdot 10^{-5}$	84,34

Tab. 4.4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung der kinetischen Parameter der Alliinase-ähnlichen Aktivität

Das isolierte Enzym zeigte zwei pH-Maxima. Die scheinbar höchste Aktivität bei pH 10 kann durch eine basenkatalysierte Reaktion zurückgeführt werden. Auch ohne Enzymzugabe kann das Pyrrolylcysteinsulfoxid bei basischen pH-Werten abgebaut werden. Es handelt sich hierbei also nicht um ein Maximum der enzymatischen Aktivität sondern um eine Nebenreaktion. Die beiden eigentlichen Maxima könnten mit der Struktur des Enzyms erklärt werden. Basierend auf den gelelektrophoretischen Messungen bestand das Enzym aus mindestens zwei Untereinheiten. Somit könnten verschiedene Isoformen des Enzyms, aufgebaut aus verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten existieren. Diese verfügen dann auch über unterschiedliche Charakteristika und über eine unterschiedliche Aktivität gegenüber dem Substrat. Demnach entspricht jedes Maximum einer Isoform, die bei diesem pH-Wert vorlag. Die

Unterschiedlichkeit von Alliinase Isoformen aus *Allium cepa* Wurzeln konnte bereits von Lancaster et al. [2000] bewiesen werden. Hier gelang die Isolierung von zwei Alliinase Isoformen, die ein stark voneinander abweichendes Verhalten zeigen.

Auf diese Isoformen ließen sich auch die Temperaturoptima zurückführen. Hierbei könnten ein oder zwei der vermuteten Isoenzyme ein Temperaturoptimum zwischen 20°C und 23°C aufweisen, was das breite zweite Maximum erklären würde. Eine weitere Isoform hätte demnach ein Optimum von 36 °C.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Literaturwerten der Alliinaseaktivität mit Alliin als Substrat zeigt deutliche Unterschiede. Die Alliinase aus Knoblauch hat nur ein, je nach Literaturquelle unterschiedlich stark ausgeprägtes pH Optimum [Jansen et al. 1989a/b, Rabinkov et al. 1994, Krest 2000a, Krest et al. 2000b]. Dieses liegt für Alliinase aus Knoblauch bei pH 6,5, bzw. 7,0.

Die Literaturwerte für das Temperaturoptimum schwanken zwischen 33 bis 35°C [Jansen et al. 1989a] und 36°C [Krest 2000a, Krest et al. 2000b]. Ebenso wie beim pH-Wert ist auch beim Temperaturoptimum der Alliinase nur ein deutliches Optimum beschrieben.

Für die Michaelis-Menten-Kinetik zeigte ein Vergleich der beiden Auswertungsmethoden, dass die Ergebnisse leicht variierten. Dies ist mit den bereits in Kapitel 2.8.4 beschriebenen unterschiedlichen mathematischen Voraussetzungen zu erklären. Bei der Methode nach Lineweaver-Burk werden die Messwerte, die einer geringeren Substratkonzentration entsprechen, übermäßig stark gewichtet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse nach Hanes genauer sind.

Ein Vergleich mit Literaturwerten ist auch hier nicht direkt möglich, da es sich um ein bisher nicht beschriebenes Protein handelt. Die Spezifität für das verwendete Substrat war sehr hoch, die  $K_m$ -Werte mit  $2,80 \cdot 10^{-5}$  M und  $2,42 \cdot 10^{-5}$  M sehr niedrig. Dagegen war die maximale Umsatzgeschwindigkeit recht niedrig.

Auch hier können die Werte mit den Literaturwerten für die Alliinaseaktivität aus Knoblauch mit Alliin als Substrat verglichen werden. Die Werte für (+)-Alliin und racemisches Alliin wurden für Alliinase aus Frischproben bestimmt. Die  $K_m$ -Werte werden mit  $1,1 \cdot 10^{-3}$  M [Rabinkov et al. 1994] und  $0,5 \cdot 10^{-3}$  M [Kazaryan und Goryachenkova 1978] für (+)-Alliin,  $2,28 \cdot 10^{-3}$  M [Krest 2000a, Krest et al. 2000b] für (-)-Alliin sowie  $2,2 \cdot 10^{-3}$  M [Jansen et al. 1989a] und  $3,3 \cdot 10^{-3}$  M [Nock und Mazelis 1986] für racemisches Alliin angegeben. Die  $V_{max}$ -Werte betragen 4334 nkat/mg

[Rabinkov et al. 1994] und 4450 nkat/mg [Kazaryan und Goryachenkova 1978] für (+)-Alliin, 1493,2 nkat/mg [Krest 2000a, Krest et al. 2000b] für (-)-Alliin sowie 3567 nkat/mg [Nock und Mazelis 1986] und 5134 nkat/mg [Jansen et al. 1989a] für racemisches Alliin.

Die Varianz unter den Literaturwerten hat verschiedene Ursachen. So wurden die Experimente unter unterschiedlichen Bedingungen wie Temperatur und pH-Wert durchgeführt. Die oben diskutierten Ergebnisse verdeutlichen die Auswirkungen dieser beiden Parameter. Eine Veränderung des pH-Wertes von pH 7 auf pH 6 erniedrigte die Aktivität von 65,2% auf 44,2%. Die Erniedrigung um eine weitere pH-Einheit führte dagegen wieder zu einer Erhöhung um 28%. Ähnliches galt für die Temperatur. Wenn bei dem Standardwert von 25°C gemessen wurde, sank die Aktivität im Vergleich zum Maximum (36°C; Aktivität: 46,6%) auf die Hälfte ab. Die angegebenen Literaturwerte wurden für sehr unterschiedliche Temperaturbedingungen bestimmt. Sie schwanken zwischen 23°C [Nock und Mazelis 1986], 25°C [Krest 2000a, Krest et al. 2000b] und 35°C [Jansen et al. 1989a]. Rabinkov et al. [1994] haben für ihre Aktivitätsbestimmungen keine Messtemperatur angegeben. Dieses Beispiel zeigt, wie wichtig ein Abgleich der Messbedingungen beim Vergleich mit den Literaturwerten ist. Außerdem basierten die Literaturwerte auf unterschiedlichen Methoden der quantitativen Proteinbestimmung. Die Differenzen zwischen den Methoden nach Lowry und Bradford wurden bereits in Kapitel 4.2.1 diskutiert.

#### 4.2.4.2 Substratspezifität der Alliinase-ähnlichen Aktivität

Zur Ermittlung der Substratspezifität wurde die Umsetzung verschiedener natürlich vorkommender Cysteinsulfoxide durch das Enzym bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Aktivitätsbestimmung für vier synthetisch zugängliche, in *Allium*-Arten nicht nachgewiesene, aromatische Derivate (Kapitel 2.8.5).

Tabelle 4.5 enthält einen Vergleich der ermittelten relativen Aktivitäten mit Literaturwerten der Alliinase aus *Allium sativum*. Für die nicht natürlich vorkommenden Cysteinsulfoxide und das Pyrrol-Derivat sind selbstverständlich keine Literaturwerte verfügbar. Die Alliinase aus Knoblauch zeigt die höchste relative Aktivität bei dem Substrat Alliin. Die Aktivität bei Methiin beträgt je nach Literaturangabe nur 20, bzw. 21%. Die Literaturangaben für die relative Aktivität bei Propiin schwanken stark. Sie liegen bei 36, bzw. 6%. Bei Butiin liegt die Aktivität bei 12%.

Die synthetischen Cysteinsulfoxide wurden als racemische Gemische eingesetzt. In der Pflanze konnten bisher nur die L-(+)-Derivate nachgewiesen werden [Koch und Lawson 1996]. Die Umsetzung der Isomeren verläuft unterschiedlich, mit unterschiedlicher Spezifität und Geschwindigkeit. Vermutlich werden die natürlich vorkommenden (+)-Isomere besser umgesetzt als die (-)-Isomere. Möglich ist hierbei auch, dass diese gar nicht als Substrat akzeptiert werden. Die ermittelten relativen Aktivitäten geben daher nur einen Überblick über die Umsetzung, entsprechen allerdings keinen genauen Werten.

Cysteinsulfoxid-Derivat	Rel. Aktivität des isolierten Enzyms %	Literaturwerte der rel. Aktivität der Alliinase aus <i>A. sativum</i>	
		Knobloch <sup>a</sup>	Krest <sup>b</sup>
<b>Pyrrol</b>	100,00	/	/
<b>Methiin</b>	-0,20	21	20
<b>Alliin</b>	30,30	100	100
<b>Propiin</b>	36,03	36	6
<b>Butiin</b>	0,13	/	12
<b>Pyridin</b>	42,42	/	/
<b>Benzol</b>	16,39	/	/
<b>Furan</b>	42,50	/	/
<b>Thiazol</b>	72,95	/	/

Tab. 4.5: Vergleich der Substratspezifität des isolierten Enzyms mit Literaturwerten für die Substratspezifität der Alliinase (Literaturwerte: a: Knobloch 1991; b: Krest 2000a/b)

Alliinase aus Knoblauch zeigt die höchste relative Aktivität mit Alliin als Substrat. Das hier untersuchte Enzym setzte dagegen Propiin etwas besser um. Möglicherweise bevorzugt das Enzym Substrate mit einem räumlich größeren Rest am Sulfoxid. Dagegen spricht allerdings, dass Butiin nicht umgesetzt wurde. Andererseits könnte Butiin durch seine relativ lange Kette von 4 C-Atomen zu sperrig für das Enzym sein.

Neben dem Butiin wurde auch Methiin nicht von dem Enzym als Substrat akzeptiert. Hier könnte der am Sulfoxid befindliche Rest mit nur einer  $\text{CH}_3$ -Gruppe sterisch zu klein sein. Die Umsetzung der einzelnen Substrate hängt davon ab, wie gut diese in die Bindungstasche des Enzyms passen und von den Seitenketten der benachbarten Aminosäuren stabilisiert werden.

Zu dieser Theorie passt auch die relativ gute Umsetzung der nicht natürlich vorkommenden Cysteinsulfoxide. Hier sind die Reste am Sulfoxid sehr groß und aromatisch. Möglicherweise wird hierdurch die Bindung an die Enzym-Bindungstasche bevorzugt. Die beste Umsetzungsrate erzielte das Thiazol-Derivat (72,95%). Dieses hat von allen drei Substraten die größte strukturelle Ähnlichkeit mit dem L-(+)-S-(3-pyrrolyl) Cysteinsulfoxid. Die Umsetzung des Pyridin-Derivates war dagegen mit 42,4% signifikant niedriger. Auch hier sind möglicherweise sterische Hinderungen verantwortlich. Das Benzol-Derivat zeigte in dieser Gruppe die schlechteste Umsetzung. Es ist hier auch das einzige Molekül ohne Heteroatom. Möglicherweise werden die anderen Substrate durch die Ausbildung von Partialladungen und ein damit verbundenes besseres Verhalten in der Bindetasche des Enzyms bevorzugt umgesetzt. Genauere Informationen über die Umsetzung der Derivate kann in Zukunft durch den Einsatz isomerenreiner Substrate erlangt werden.

Ohne eine vollständige Aufklärung des Enzyms und seiner Struktur sowie der Identifizierung der Bindungsdomäne bleiben diese Begründungen spekulativ und können nicht bewiesen werden. Auch die Bestimmung der Spezifität gegenüber weiteren synthetisch hergestellten möglichen Substraten könnte weitere Anhaltspunkte liefern.

#### 4.2.4.3 Hemmung der Alliinase-ähnlichen Aktivität

Die Alliinase-ähnliche Aktivität konnte durch Zugabe von Aminoxyessigsäure komplett inhibiert werden. Dies spricht für Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) als Coenzym und damit für ein Enzym aus der Gruppe der Vitamin B6 Enzyme. Coenzyme fungieren als Reagenz zum Transfer von chemischen Gruppen. Dies können Wasserstoff-Ionen oder Elektronen sein, aber auch größere kovalent gebundene Gruppen. Coenzyme werden nach der Stärke ihrer Bindung zum Enzym unterteilt. Ist die Bindung locker spricht man von Cosubstraten, sind sie dagegen fest gebunden von prosthetischen Gruppen [Horton et al. 2002]. Die feste Bindung der prosthetischen Gruppe kann durch kovalente Bindungen oder durch mehrere schwächere Bindungen an das Apoenzym

erreicht werden. Cosubstrate in enzymatischen Reaktionen werden während der Reaktion verändert und von der aktiven Tasche gelöst. Im Anschluss werden sie von einem anderen Enzym rückgewandelt und stehen damit wieder der enzymatischen Reaktion zur Verfügung [Horton et al. 2002].

Die Familie der B6 Vitamine besteht aus drei einander sehr ähnlichen Molekülen (Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin; die Struktur der Moleküle ist in Abbildung 4.11 dargestellt), die sich nur in ihrem Grad der Oxidation oder Amination an der Kohlenstoffbindung an Position C4 des Pyridinrings unterscheiden [Horton et al. 2002]. PLP stellt somit neben Pyridoxamin-5'-phosphat die biologisch aktive Form des Vitamin B6 dar. Vitamin B6 Enzyme spielen vor allem beim Aminosäurestoffwechsel eine wichtige Rolle [Schneider et al. 2000]. Die Gruppe der PLP abhängigen Enzyme ist sehr divers und katalysiert die unterschiedlichsten Reaktionen, wie Decarboxylierungen, Razemisierungen, Transaminierungen oder  $\beta$ -Eliminationen [Toney 2005].

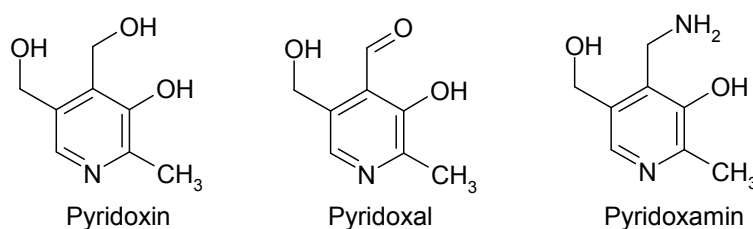


Abb. 4.11: Strukturen der Moleküle der Vitamin B6 Gruppe: Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin

Der erste allgemeine Schritt aller PLP abhängigen Enzyme ist eine Transaminierung, d.h. die Austauschreaktion einer Schiff'schen Base. In den bisher bekannten Enzymen liegt das PLP im Ruhezustand als Schiff'sche Base vor. Es ist hierbei an einen Lysinrest im aktiven Zentrum des Proteins gebunden (inneres Aldimin). Das Substrat verdrängt den Lysinrest aus der Bindung und bildet ein neues, „äußeres“ Aldimin. Diese mehrstufige Reaktion ist sehr schnell, in der Regel schneller als die nachfolgende Umsetzung. Durch heterolytische Spaltung einer Bindung am C $\alpha$ , außer der C-N Bindung, werden Carbanionen gebildet, die von diesem Zwischenzustand stabilisiert werden können. Die Stabilisierung erfolgt vermutlich über Delokalisation der Ladung über das erweiterte konjugierte  $\pi$ -System. Eine dieser Resonanzstrukturen wird aufgrund der Ähnlichkeit zu Chinonen als „chinoid“ bezeichnet (Abb. 4.12). Diese

Struktur wird als hauptverantwortlich für die katalytische Aktivität diskutiert, da die Elektronen des C $\alpha$  vom protonierten Stickstoff neutralisiert werden [Toney 2005].

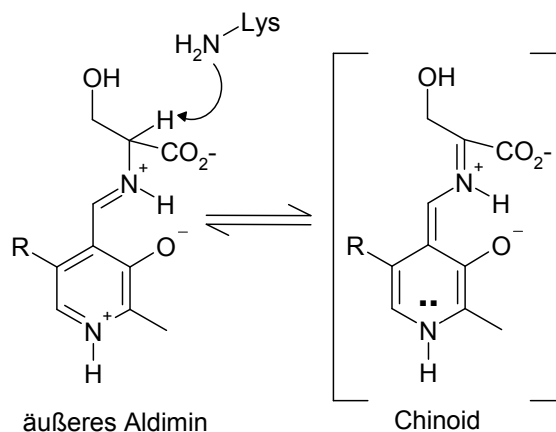


Abb. 4.12: Stabilisierung des äußeren Aldimins über eine chinoide Grenzstruktur

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Faltung lassen sich fünf verschiedene Typen von Vitamin B6-abhängigen Enzymen unterscheiden. Die PLP abhängigen Enzyme sind untereinander sehr verschieden, die Übereinstimmung in der Sequenz beträgt nur 20-25% [Küttner et al. 2002]. Trotz der großen Unterschiede sind in allen Typen gewisse Bereiche in der aktiven Tasche konserviert [Schneider et al. 2000].

Zu den PLP-abhängigen Enzymen gehören auch die CS-Lyasen. Diese katalysieren die Reaktion von Alkyl-Cysteinen oder Alkyl-Cysteinsulfoxiden zu Thiosulfinaten, Pyruvat und Ammoniak, eine  $\beta$ -Elimination. Sie wurden bisher hauptsächlich in *Allium*- und *Brassica*-Spezies untersucht und sind in diesen Pflanzen verantwortlich für die Entwicklung von charakteristischen Aromakomponenten [Ramirez und Whitaker 1998]. Für Alliinase aus *A. sativum* konnte gezeigt werden, dass auch hier das PLP kovalent gebunden in der Bindungstasche des Enzyms vorliegt. Die Bindungstasche der Alliinase befindet sich an der Schnittstelle der zwei Untereinheiten. Das PLP ist als Schiff'sche Base an Lys251 gebunden. Der Pyridin-Ring wird durch CH--- $\pi$  Wasserstoffbindungen von den aromatischen Ringen von Tyr165 und/oder der Isopropylgruppe von Val227 stabilisiert, sowie von einer Wasserstoffbindung von Asp225 zum Pyridinium-Stickstoff und von Asn207 und Tyr228 zur Phenolgruppe. Zusammengenommen wird das PLP also sehr fest an das Enzym gebunden, so dass

das Molekül gebunden bleibt, wenn die kovalente Bindung während der Reaktion gespalten wird [Küttner et al. 2002a/b].

In der Holo-Form der Alliinase konnten Shimon et al. einen ungewöhnlichen, stabilen Aminoacrylat-PLP Komplex nachweisen. Die aktive Seite des Enzyms befindet sich an der Schnittstelle der Untereinheiten. Die PLP-AA Zwischenstufe ist tief in einer katalytischen Tasche über spezifische Interaktionen des Aminoacrylatrestes fest gebunden [Shimon et al. 2002, 2007].

Shimon et al. haben neben der Holo-Form der Alliinase auch die Apo-Form untersucht. In der aktiven Seite unterscheiden sich diese beiden Formen kaum. Statt PLP sind hier zwei Sulfationen, Wasser und Acetat enthalten. Dabei nimmt ein Sulfat die Position des Phosphates ein, zwei Sauerstoffatome des zweiten Sulfates ersetzen die Carboxylat-Gruppe des Aminoacrylat. Acetat und die zwei Wassermoleküle imitieren den Pyridinring des PLP [Shimon et al. 2002, 2007].

Da es sich bei der Umsetzung der Cysteinsulfoxide um eine Alliinase-ähnliche Reaktion handelte, sind die Verhältnisse in der Bindungstasche vermutlich ähnlich. Dafür spricht der relativ hohe Anteil an konservierten Regionen in der Bindungstasche der PLP-abhängigen Enzyme [Schneider et al. 2000].

Bei der Enzyminhibition durch Aminoxyacetat verschob sich das UV-Maximum von 360 zu 385 nm. Das ursprüngliche Signal ist auf die Aldimin Gruppe aus Enzym und prosthetischer Gruppe zurückzuführen. Die Verschiebung wird vermutlich durch die Substitution der Aminogruppe des Aminoxyacetats unter Bildung eines Oxims bedingt. Diese Reaktion und damit auch die Hemmung durch Aminoxyacetat ist irreversibel. Wird der Inhibitor in einer Menge zugesetzt, die mindestens der stöchiometrischen Menge des Enzyms entspricht, ist die Inhibition vollständig [John et al. 1978].

#### 4.2.4.4 Vergleich des neu isolierten Proteins mit Alliinase

Aus den Ähnlichkeiten der Alliinase aus Knoblauch und des neu isolierten Enzyms lassen sich einige Schlussfolgerungen ziehen. Beide Enzyme katalysieren sehr ähnliche Reaktionen, eine beta-Elimination mit Cysteinsulfoxiden als Substrat. Die Substratspezifität ist leicht unterschiedlich; die höchsten Enzymaktivitäten sind mit den natürlichen Substraten zu beobachten. Das neu isolierte Enzym setzte daneben auch



andere Cysteinsulfoxide um. Das S-Pyrrolylcysteinsulfoxid wurde auch von der Knoblauch-Alliinase umgesetzt (vgl. Kapitel 4.4).

Die Struktur der Alliinase aus *Allium sativum* wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. So wurden auch Röntgenstrukturanalysen der Enzymkristalle durchgeführt, durch die einige neue Erkenntnisse gewonnen werden konnten. Alliinase ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut, die aus jeweils 448 Aminosäuren bestehen [Kuettner et al. 2002a/b]. Jede Untereinheit besteht wiederum aus drei Domänen. Es handelt sich hierbei um den N-terminalen, den C-terminalen sowie den zentralen PLP-Bindungsbereich. Erstaunlicherweise konnte auch ein EGF-ähnlicher Bereich nachgewiesen werden. EGF ist der Epidermale Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor) der als Signalmolekül zur Einleitung der Mitose dient. Hierbei handelt es sich um kleine, Disulfid reiche Strukturen. Häufig umfassen diese Domänen Bereiche, die für die Bindung an andere Proteine verantwortlich sind [Campbell und Bork 1993]. Dies ist ungewöhnlich, da EGF-ähnliche Bereiche hauptsächlich in Tierproteinen vorkommen. In Pflanzen können sie normalerweise nicht nachgewiesen werden, oder nur als der extrazelluläre Teil von Membran gebundenen oder sekretierten Proteinen. Die Funktion dieser EGF-ähnlichen Domäne ist nicht bekannt.

Auch das neu isolierte Enzym besitzt eine PLP-Bindungsdomäne, da dieses als Cofaktor für die enzymatische Aktivität benötigt wurde. Da die PLP-Bindungsdomänen hoch konserviert sind [Schneider et al. 2000], kann hier von strukturellen Ähnlichkeiten ausgegangen werden. Die Umsetzung des Substrates über ein Aldimin, wie sie bei PLP-abhängigen Enzymen üblich ist, ist daher wahrscheinlich. Für Informationen über das Vorhandensein einer EGF-ähnlichen Domäne müssen weitere Sequenzinformationen ermittelt werden.

Alliinase ist an zwei Stellen glykosyliert (Asn146 und Asn328), die Hauptzuckerkette besteht aus  $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)[\text{Fuc}(\alpha 1-3)]\text{GlcNAc}(\beta 1-N)\text{Asn}$  (Man: Mannose; GlcNAc: N-Acetylglucosamine; Fuc: Fucose). Die Zuckerkette an Asn146 ist an beide Untereinheiten gebunden und stabilisiert damit das Dimer [Küttner et al. 2002]. Der Grad der Glykosylierung an Asn191 und Asn328 variiert abhängig vom Monomer und der Kristallform. Sowohl die Holo- als auch die Apo-Form liegen glykosyliert vor [Shimon et al. 2002, 2007]. Da eine Aufreinigung mit Mannose und Glucose bindenden Lektinen möglich ist, ist auch das isolierte Protein ein Glykoprotein. Die

Zuckerseitenkette enthält vermutlich mehr Mannose als die der Alliinase, da die Bindung an Con A wesentlich stärker ist.

In Alliinase konnte zusätzlich eine Chlorid-Bindungsstelle nachgewiesen werden. Die Bindung erfolgt hierbei über drei Amid-NH-Gruppen (Phe94, Ser98, Phe100) und ein Wassermolekül. Dies erklärt auch die stabilisierenden Effekte von NaCl auf das Enzym [Küttner et al. 2002]. Da auch das neu isolierte Enzym von Kochsalz stabilisiert wird, sind auch hier Chlorid-Bindestellen sehr wahrscheinlich.

Die aktive Bindungstasche der Alliinase setzt sich aus Resten beider Untereinheiten zusammen. Pro Dimer existieren zwei identische Bindungsstellen, die sich an den Schnittstellen der beiden Untereinheiten befinden. So sind beide Untereinheiten an der Bindung beteiligt [Shimon et al. 2002, 2007]. Das neu isolierte Enzym besteht aus mehr als zwei Untereinheiten. Diese sind nicht wie bei der Alliinase homolog. Außerdem scheint es sich im Gegensatz zur Alliinase um ein vegetatives Speicherprotein zu handeln. Von Alliinase ist in diesem Zusammenhang eine Bindung an Mannose bindende Lektine aus dem Knoblauch bekannt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass trotz der großen Unterschiede bezüglich der Untereinheiten und ihrer Zusammensetzung vermutlich große Ähnlichkeiten zwischen beiden Enzymen bestehen. Diese ergeben sich aus den analogen Reaktionen der Enzyme. Allerdings weist das neu isolierte Enzym zusätzlich eine Polyphenoloxidase-Aktivität auf, die bei der Alliinase nicht beobachtet werden kann. Eine Sequenzähnlichkeit konnte eher zu Speicherproteinen als zur Alliinase festgestellt werden.

#### *4.2.4.5 Charakterisierung der Polyphenoloxidase-Aktivität*

Bei der Aufreinigung des Enzyms wurde festgestellt, dass dieses Enzym eine Polyphenoloxidase-Nebenaktivität aufweist. Da für diese Aktivität kein natürliches Substrat bekannt ist, wurden zwei verfügbare Polyphenole ausgewählt und die Aktivität anhand dieser Beispielsubstanzen charakterisiert. Hierzu wurden Brenzcatechin und Dopamin ausgewählt (Abb. 4.13). Beide Substanzen wurden ausreichend von dem Enzym umgesetzt. Die Reaktion zu den braunen Chinonen konnte bei 340 nm und 405 nm direkt photometrisch bestimmt werden.

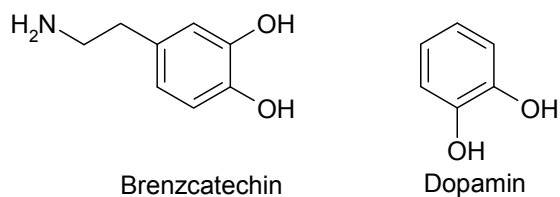


Abb. 4.13 Struktur der als Substrate verwendeten Polyphenole Brenzcatechin und Dopamin

pH	340 nm		405 nm	
	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung
6,5	22,39	3,47	68,90	9,94
7,5	32,78	5,19	79,88	12,10
8	34,16	3,76	57,32	9,33
9	37,17	16,17	100,00	22,27

Temp [°C]	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung
20	69,86	2,36	100,00	2,44
30	87,94	11,64	69,51	12,96
34	100,00	13,14	82,93	4,56

	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]
<b>Lineweaver-Burk</b>	0,16	$1,04 \cdot 10^7$	0,15	$1,80 \cdot 10^7$
<b>Hanes</b>	0,22	$1,13 \cdot 10^{10}$	0,32	$2,38 \cdot 10^{10}$

Tab. 4.6: Zusammenfassung der Bestimmung der kinetischen Parameter für die Polyphenoloxidase-Aktivität für Brenzcatechin als Substrat

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Polyphenoloxidase-Aktivität sind für Brenzcatechin in Tabelle 4.6 und für Dopamin in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Bei der Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums für Brenzcatechin lassen sich also drei Optima nachweisen. Die scheinbar hohe Aktivität bei pH 11 ist vermutlich auf eine basenkatalysierte Oxidation zurückzuführen. Das Substrat wird also bei hohen pH-Werten auch ohne Zusatz von Enzymen oxidiert. Auf eine tatsächliche enzymatische Aktivität sind damit die beiden weiteren pH-Optima zurückzuführen. Dies deutet auf das Vorhandensein von verschiedenen Isoenzymen hin, die bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen eine optimale Umsetzung erreichen.

pH	340 nm		405 nm	
	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung
8,5	51,28	4,75	39,57	6,01
9	39,36	3,67	48,07	6,64
10	100,00	14,93	95,41	8,35

Temp [°C]	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung
32	43,88	6,32	44,02	5,83
38	100,00	5,46	100,00	4,89
40	26,48	7,77	25,82	6,64

	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]
<b>Lineweaver-Burk</b>	0,66	$2,07 \cdot 10^7$	1,16	$7,31 \cdot 10^7$
<b>Hanes</b>	1,02	$2,68 \cdot 10^{10}$	1,54	$9,44 \cdot 10^{10}$

Tab. 4.7: Zusammenfassung der Bestimmung der kinetischen Parameter für die Polyphenoloxidase-Aktivität für Dopamin als Substrat

Der Verlauf der Aktivität in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur zeigt für Dopamin einen signifikant anderen Verlauf als für Brenzcatechin. Der maximale Umsatz wird bei pH 10,0, bzw. 11,0 erreicht. Unterhalb von pH 8,0 ist die Aktivität sehr

niedrig (unter 20%). Erst bei pH 8,5 erreicht sie mit 51,3% ein kleineres Maximum. Auch hier sind die scheinbar hohen Aktivitäten bei basischen pH-Werten auf eine nicht enzymatische Oxidation zurückzuführen. Dopamin wird hier bei pH 10,0 oder 11,0 basenkatalysiert oxidiert. Das eigentliche pH-Optimum befindet sich also bei pH 8,5. Die Temperaturabhängigkeit zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die pH-Abhängigkeit. Unterhalb von 30°C liegen die Aktivitäten mit unter 20% sehr niedrig. Das Maximum liegt bei 38°C.

Diese Unterschiede in den Kurvenverläufen überraschen. Eigentlich sollten diese annähernd parallel verlaufen, da beide Substrate gleich umgesetzt werden müssten. Die unterschiedlichen Charakteristika zeigen, dass Brenzcatechin und Dopamin mit einem unterschiedlichen Mechanismus umgesetzt werden. Zum Verständnis dieser Beobachtung sind weitere Strukturinformationen, besonders über die Bindungstasche, nötig.

Die  $K_m$ -Werte liegen bei 0,16 (0,15) mol/l nach Lineweaver-Burk, bzw. 0,22 (0,32) mol/l nach Hanes für Brenzcatechin. Für Dopamin betragen sie 0,66 (1,16) mol/l nach Lineweaver-Burk, bzw. 1,02 (1,54) mol/l nach Hanes. Die  $K_m$ -Werte sind also sehr hoch, die Umsetzung der eingesetzten Polyphenole ist sehr unspezifisch. Dies war zu erwarten, da es sich bei der Polyphenoloxidase-Aktivität nur um eine Nebenaktivität des isolierten Enzyms handelt und die Substrate lediglich Modellsubstanzen sind. Ob diese Aktivität eine Funktion in der Pflanze hat, ist ebenfalls nicht bekannt. Es könnte sich um ein Artefakt handeln. Wenn die Polyphenoloxidase-Aktivität eine natürliche Funktion in der Pflanze hat, ist das natürliche Substrat des Enzyms nicht bekannt.

Auch die  $V_{max}$ -Werte sind für beide Substanzen sehr hoch. Für Brenzcatechin betragen sie  $1,04 \cdot 10^7$  ( $1,80 \cdot 10^7$ ) nkat/mg nach Lineweaver-Burk, bzw.  $1,13 \cdot 10^1$  ( $2,38 \cdot 10^{10}$ ) nkat/mg nach Hanes; für Dopamin  $2,07 \cdot 10^7$  ( $7,31 \cdot 10^7$ ) nkat/mg nach Lineweaver-Burk, bzw.  $2,68 \cdot 10^{10}$  ( $9,44 \cdot 10^{10}$ ) nkat/mg nach Hanes. Die Werte sind sehr hoch, das heißt die Umsetzung ist sehr schnell. Selbst die Modellsubstanzen Dopamin und Brenzcatechin, die nicht die natürlichen Substrate darstellen, werden also schnell umgesetzt.

Polyphenoloxidasen aus *Allium*-Spezies sind bisher kaum beschrieben worden. Diese Enzyme sind normalerweise beteiligt an der sogenannten enzymatischen Bräunung von Früchten und Gemüsearten [Martinez und Whitaker 1995]. Es wurden einige Studien veröffentlicht die belegen, dass Extrakte aus der Küchenzwiebel oder aus Knoblauch diese enzymatische Reaktion inhibieren [Kim et al. 2005; Roldán et al.

2008]. Welche Substanzen an diesen Reaktionen genau beteiligt sind, ist allerdings noch nicht bekannt. Diskutiert werden allerdings Thiolhaltige Substanzen [Eissa et al. 2006].

Aus *Allium* sp. konnte eine Polyphenoloxidase isoliert werden, deren Reaktion mit DL-Dopa und Brenzcatechin untersucht wurde. Die  $K_m$ -Werte betrugen 25 mM für Brenzcatechin und 33 mM für DL-Dopa. Die  $V_{max}$ -Werte betrugen 666 EU/ml ( $1,1 \cdot 10^4$  nkat/ml) für Brenzcatechin und 166 EU/ml ( $2,7 \cdot 10^3$  nkat/ml) für DL-Dopa. Das pH-Optimum lag bei pH 7,5 [Arslan et al. 1997]. Verglichen zu dem hier isolierten Enzym sind die  $K_m$ -Werte niedriger, die eingesetzten Polyphenole werden damit besser umgesetzt.

Polyphenoloxidasen in höheren Pflanzen haben eine Vielzahl von Polyphenolverbindungen als mögliche Substrate zur Verfügung. Dies führt dazu, dass die Affinität dieser Enzyme zu den Substraten in der Regel gering sind. Die  $K_m$ -Werte sind hoch, normalerweise um 1 mM, können aber in einigen Fällen auch deutlich niedriger liegen (0,01 bis 0,1 mM) [Mayer und Harel 1978]. Beispielsweise konnten Polyphenoloxidasen mit  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werten von 10,2 mM und 19662 U/ml ( $3,28 \cdot 10^5$  nkat/ml) für Brenzcatechin und 36,3 mM und 6060 U/ml ( $1,01 \cdot 10^5$  nkat/ml) DL-Dopa in Artischocken [Aydemir 2004], 5,5 mM für Pyrrogallol in Thymian [Dogan und Dogan 2004] und 2,34 mM und 8541 EU/ml ( $1,42 \cdot 10^5$  nkat/ml) für Brenzcatechin aus *Ferula* sp. [Erat et al. 2006] nachgewiesen werden. Die hier vorliegende Polyphenoloxidase hat eine wesentlich geringere Affinität zu den getesteten Polyphenolen. Als natürliche Substrate kommen hier wohl in erster Linie Flavanoide in Frage. In *Allium*-Arten konnte vor allem Quercetin nachgewiesen werden [Patil et al. 1995a/b, Koch und Lawson]. Des weiteren könnte das Enzym auch für die Oxidation des Farbstoffes und der Folge- und Nebenprodukte der Reaktion verantwortlich sein (vgl. Kapitel 4.4). Damit wäre auch die geringe Affinität zu den untersuchten Polyphenolen zu erklären. In diesem Fall würden die Polyphenole neben den Farbstoffderivaten nur als Nebensubstrate umgesetzt werden. Die genauere Funktion dieser Oxidase-Aktivität muss in Zukunft untersucht werden.

#### 4.2.4.6 Bestimmung der Substratspezifität der Polyphenoloxidase-Aktivität

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurden verschiedene Polyphenole mit dem Enzym umgesetzt und die relative spezifische Aktivität für die jeweilige Substanz bestimmt. Als Substrate wurden neben Dopamin und Brenzcatechin, Hydrochinon,

Resorcin, Kaffeesäure und Gallussäure verwendet (Abb. 4.14). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

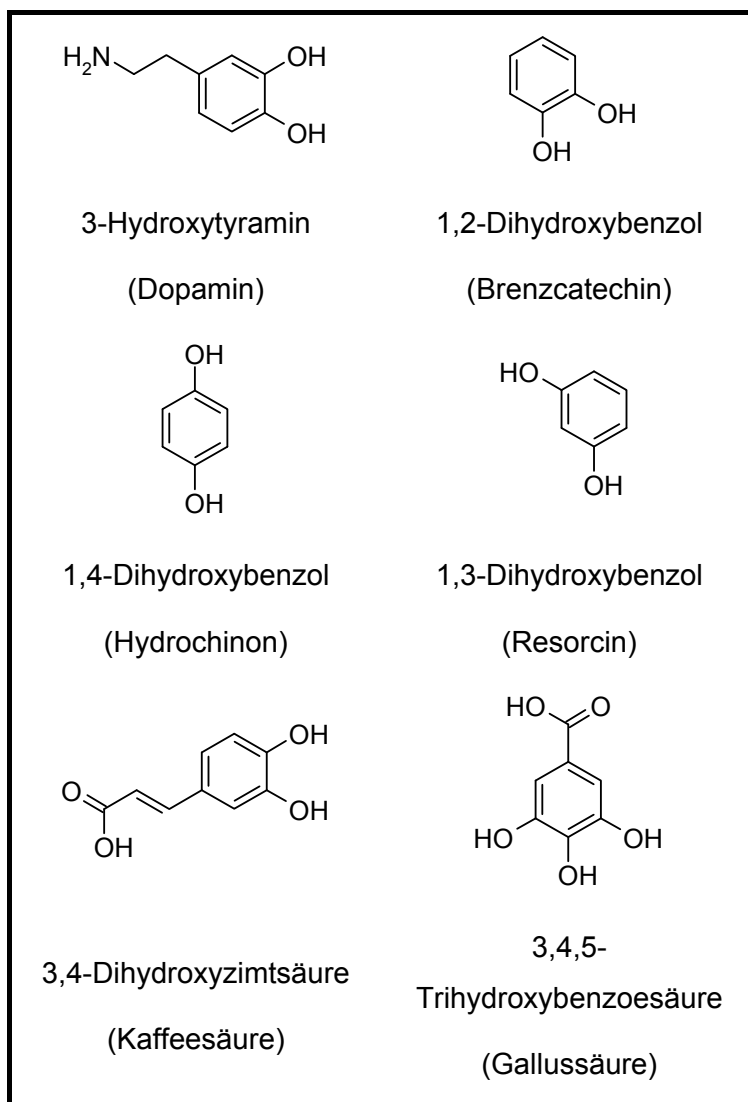


Abb. 4.14 Strukturen der eingesetzten Polyphenole

umgesetzt. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Säuregruppe direkt am Benzolring die Umsetzung nicht im gleichen Maße positiv beeinflusst wie eine Alkylgruppe. Auf der anderen Seite könnten auch die drei direkt benachbarten Hydroxylgruppen die Bindung in der katalytischen Tasche sterisch blockieren.

Brenzcatechin, Hydrochinon und Resorcin sind Dihydroxybenzole, die sich nur durch die Stellung der Hydroxylgruppen unterscheiden. Von diesen Substanzen wird das Brenzcatechin am besten umgesetzt, das Hydrochinon nur etwas schlechter. Das

Die höchste relative Aktivität weist Dopamin auf. Die zweithöchste Umsetzung zeigt Kaffeesäure. Diese beiden Polyphenole weisen neben den beiden Hydroxylgruppen noch eine dritte funktionelle Gruppe am Benzolring auf. Dopamin ist mit einem Aminrest an einer Alkylkette substituiert, Kaffeesäure mit einer Alkyl-carbonsäuregruppe.

Offensichtlich führt eine weitere Alkylsubstitution am Ring zu einer erhöhten Umsetzung. Die Amingruppe scheint hierbei besser geeignet als die Carbonsäuregruppe.

Dagegen wird Gallussäure, die eine dreifach hydroxylierte Benzoessäure darstellt, weit weniger

orthosubstituierte Derivat wird also am besten umgesetzt, das para-substituierte nur geringfügig schlechter.

Substanz	340 nm		405 nm	
	rel. Aktivität %	Standard-abweichung	rel. Aktivität %	Standard-abweichung
<b>Resorcin</b>	1,50*10 <sup>-4</sup>	3,28	1,14	2,65
<b>Hydrochinon</b>	36,89	3,49	16,57	2,65
<b>Gallussäure</b>	28,96	5,74	10,00	0,86
<b>Kaffeesäure</b>	51,22	5,03	24,71	7,28
<b>Brenzcatechin</b>	43,90	3,45	23,71	2,47
<b>Dopamin</b>	100,00	38,76	100,00	2,86

Tab. 4.8: Substratspezifität der Polyphenoloxidase-Aktivität

Praktisch nicht umgesetzt wird Resorcin. Resorcin ist das einzige meta-substituierte Polyphenol im Test. Daher ist aus diesem Ergebnis zu schließen, dass das Enzym spezifisch ortho- und para-substituierte Polyphenole umsetzt. Es handelt sich also um eine  $\sigma$ -Diphenolase, wie die meisten Catecholasen. Weitere Alkylgruppen am Ring scheinen die Umsetzung zu aktivieren.

#### 4.2.4.7 Hemmung der Polyphenoloxidase-Aktivität

Durch Inkubation der Enzymlösungen mit EDTA konnte die Polyphenoloxidase-Aktivität nicht komplett inhibiert werden. Nach einer Stunde Inkubation waren noch 45% der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Dieses Ergebnis zeigt dennoch, dass die Aktivität durch Entfernen von Metallionen vermindert werden kann. Die enzymatische Aktivität bezogen auf die Oxidation von Polyphenolen ist also von Metallionen als Cofaktor abhängig.

Cofaktoren sind nötig um inaktive Apoenzyme in aktive Holoenzyme zu transferieren. Man unterscheidet zwischen essentiellen Ionen, meist Metallionen und organischen Komponenten, den sogenannten Coenzymen. Einige Ionen, die ein Enzym aktivieren,



sind reversibel gebunden und oft an der Bindung der Substrate beteiligt. Dagegen sind gewisse Kationen fest gebunden und auch häufiger direkt an der Reaktion beteiligt [Horton et al. 2002]. Man unterscheidet hier zwischen durch Metallionen aktivierten Enzymen und Metalloenzymen. Erstere werden durch die Anwesenheit von ein- oder zweiwertigen Ionen, wie Calcium, Magnesium oder Kalium aktiviert, letztere enthalten ein fest gebundenes Metallion in ihrer Bindungstasche, meist Eisen oder Zink, aber auch Kupfer und Kobalt [Horton et al. 2002]. Ein Drittel bis die Hälfte aller bekannten Proteine sind Metalloproteine [Butler 1998].

Zusätzlich wurde die Auswirkung der Zugabe unterschiedlicher Metallionen auf die Aktivität des Enzyms untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Erstaunlicherweise zeigte sich, dass Zinkionen den größten Einfluss auf die Aktivität haben. Die Zugabe von Kupfer führte nur zu einer geringen Steigerung der Aktivität. Kobaltionen zeigten nur bei einer Wellenlänge von 405 nm eine leichte Steigerung der Aktivität, nicht jedoch bei 340 nm. Die Zugabe von Zink- und Kupferionen führte zu keiner höheren Aktivität als die Zugabe von Zinkionen alleine.

<b>Metallion</b>	<b>rel. Aktivität</b>	
	<b>340 nm</b>	<b>405 nm</b>
<b>Zink</b>	100,00	100,00
<b>Kupfer</b>	5,14	14,04
<b>Kobalt</b>	-0,73	7,02
<b>Magnesium</b>	0,00	-3,51
<b>Mangan</b>	-23,15	-177,78
<b>Eisen</b>	-54,38	-145,61

*Tab. 4.9 Auswirkung der Zugabe von Metallionen zu EDTA-inaktivierten Enzymextrakten auf die relative Aktivität*

Dieses Ergebnis ist überraschend, da Polyphenoloxidasen normalerweise zwei Kupferionen in ihrem aktiven Zentrum enthalten. Diese sind über sechs oder sieben Histidinreste und einen Cysteinrest gebunden. Die Enzyme fügen Sauerstoff aus molekularem Sauerstoff in ortho-Position zu einer existierenden Hydroxylgruppe an

einen aromatischen Ring ein. Im Anschluss folgt die Oxidation des Diphenols zum Chinon (Abb. 4.15). Enzyme, die nur diesen zweiten Teilschritt katalysieren, werden als Catecholoxidasen (EC 1.10.3.2) bezeichnet; Enzyme die nur den ersten Schritt katalysieren als Cresolasen. Tyrosinase (EC 1.14.18.1) ist der Sammelbegriff für Enzyme die beide Teilschritte katalysieren [Mayer 2006]. Die Monophenoloxidase-Aktivität wird immer von einer Diphenolase-Aktivität begleitet. Auf der anderen Seite weisen Polyphenoloxidasen nicht immer eine Monophenoloxidase-Aktivität auf [Yoruk und Marshall 2003]. Ein weiterer Vertreter der Polyphenoloxidasen ist die Laccase. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von p-Polyphenolen [Yoruk und Marshall 2003].

Die entstehenden Chinone polymerisieren oder reagieren mit Aminosäuren in nachfolgenden Reaktionen zu hochmolekularen braunen und schwarzen Pigmenten, den Melaninen [Marusek et al. 2006]. Enzyme dieser Gruppe sind sehr weit verbreitet und fast als ubiquitär zu bezeichnen. Sie umfasst sehr unterschiedliche Enzyme, die sich in Sequenz, Glykosylierung und Aktivierung unterscheiden [Mayer 2006]. Die Funktion der Polyphenoloxidasen in vivo ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Aufgrund der enzymatischen Bräunungsreaktion von Früchten und Gemüse wird allerdings ein Selbstverteidigungsmechanismus gegen Insekten und Pathogene angenommen. So wird z.B. die Bildung der Tyrosinase in Äpfeln hochreguliert, wenn diese beschädigt werden. Hier befindet sich das Enzym in den Chloroplasten während sich die Substrate in der Vakuole befinden. Erst durch eine Beschädigung des Zellgewebes kann es zur Reaktion kommen [Boss et al. 1995].

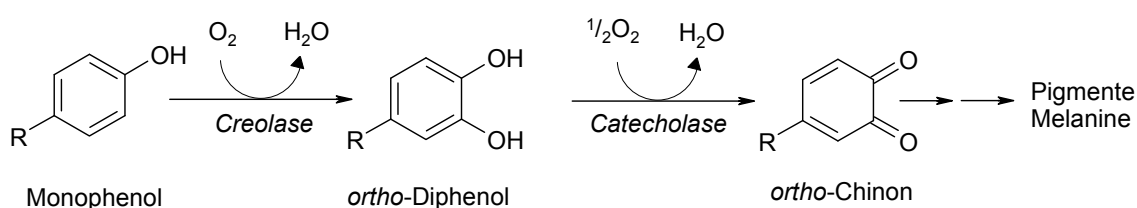


Abb. 4.15: Tyrosinase-Aktivität nach Marusek

Inhibitoren der Polyphenoloxidase-Aktivität können in sechs Gruppen unterteilt werden. Diese unterscheiden sich in ihrem Wirkungsmechanismus. Man unterscheidet zwischen Reduktionsmitteln (Ascorbinsäure, Sulfite), Chelatbildnern (EDTA, Natriumiethyldithiocarbamat, Natriumazid) Komplexbildnern (Cyclodextrine, Chitosane), Säuerungsmitteln (Ascorbinsäure, Citronensäure, Phosphorsäure),

Enzyminhibitoren wie Substratanaloga oder Enzyme (Proteasen oder Methyltransferasen) [McEvily et al. 1992].

Ein weiteres Protein mit zwei Kupfer-Ionen im aktiven Zentrum und mit einer großen strukturellen Ähnlichkeit zu den Polyphenoloxidasen ist Hämocystein. Hämocystein ist ein Sauerstoff transportierendes Protein aus dem Blut der Mollusken und Arthropoden. Man unterscheidet zwei Gruppen von Hämocysteinen, die sich in der Größe und der Organisation der Untereinheiten sowie ihrer Herkunft unterscheiden. Eine Gruppe kann in Mollusken, die andere in Arthropoden nachgewiesen werden. Diese Proteine können eine Größe von bis zu 9 Millionen Dalton erreichen und mehrere Sauerstoff-Bindungsstellen aufweisen. Der Sauerstoff wird als Peroxid-Ion gespeichert, dabei werden die Kupfer-Ionen von Cu(I) zu Cu(II) oxidiert. Dies ist für die charakteristische blaue Farbe der sauerstoffgesättigten Proteine verantwortlich, von der diese auch ihren Namen ableiten [Cuff et al. 1998]. Einige Hämocysteine aus Mollusken zeigen auch eine sehr schwache Tyrosinase oder Catecholoxidase-Aktivität, die allerdings durch Aktivierung der Enzyme erhöht werden kann [Salvato et al. 1998].

Als erstes Zink enthaltendes Metalloenzym wurde 1949 die Carboanhydrase II (EC 4.2.1.1) von Keilin und Mann isoliert. Dieses Enzym gehört wohl auch zu den am besten untersuchten zinkhaltigen Enzymen.

Im Gegensatz zu den anderen Übergangsmetallen geht Zink aufgrund des gefüllten d-Orbitals keine Redoxreaktionen ein. Es fungiert als Lewis Säure und ist damit ideal für Reaktionen, die ein redoxstabiles Ion erfordern, wie Proteolysen [Williams 1987, Butler 1998]. Zusätzlich wird durch die aufgefüllte d-Schale keine geometrische Anordnung der Liganden energetisch bevorzugt. Dadurch können Reaktionen katalysiert werden, die eine Konformationsänderung am Zink-Atom beinhalten. Außerdem kann hierdurch ein schneller Ligandenwechsel stattfinden [Cotton et al. 1999].

Das Zink-Atom kann im Protein an die unterschiedlichsten Aminosäureseitenketten gebunden sein. Die Bindung kann hier über Stickstoff (Histidin), Sauerstoff (Aspartat oder Glutamat) oder über Schwefel (Cystein) erfolgen, wobei die Bindung über Histidin am häufigsten vorkommt [Gregory et al. 1993]. Des weiteren können in seltenen Fällen als Liganden auch die Hydroxylgruppe des Tyrosins, der Carbonyl Sauerstoff des Protein-Grundgerüsts oder der Asparagin- oder Glutaminreste vorkommen.

Zink kann in Enzymen als Katalysator, als Cokatalysator oder zur Strukturbildung dienen. Als katalytisches Element befindet sich das Zinkion unmittelbar in der Enzymbindungs tasche und nimmt direkt an der Reaktion teil. Als Cofaktor der Reaktion

dienen Zink-Atome z.B. bei der alkalischen Phosphatase oder bei der Phospholipase C. Hierbei liegen in der Regel mehrere Zinkatome in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander vor. Es können auch andere Metallionen vorliegen, wie z.B. Magnesium im Falle der alkalischen Phosphatase (zwei Zink- und ein Magnesium-Atom). Die Zinkionen erhöhen hierbei die enzymatische Aktivität.

Zur Strukturbildung liegt das Zink meist tetraedrisch an vier Aminosäureseitenketten koordiniert vor. Die hohe Stabilität dieser Komplexe stellen eine Stabilisierung der Struktur dar, die der stabilisierenden Wirkung von Disulfidbindungen entspricht.

Eine weitere Enzymgruppe die Zinkionen enthält sind die Cu,Zn-Superoxid Dismutasen. Superoxid Dismutasen (SOD) katalysieren die Reaktion des Superoxidradikales mit Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid. Auch diese Enzymgruppe spielt also eine wichtige antioxidative Rolle zum Schutz der Pflanze. Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Superoxid Dismutasen nach ihrem metallischen Kofaktor: Kupfer-Zink (Cu,Zn-SOD), Mangan (Mn-SOD) und Eisen (Fe-SOD). In Pflanzen kommen hauptsächlich Cu,Zn-SOD vor [Fridovich 1975].

Cu,Zn-SOD sind sehr weit verbreitet. Sie bestehen aus zwei identischen Untereinheiten und enthalten je ein Kupfer- und ein Zinkion pro Untereinheit. Die Aktivität kann durch Zugabe von Kupfer wiederhergestellt werden. Weitere Zugabe von Zink erhöht die Aktivität. Ohne Kupfer sind die Enzyme vollständig inaktiv, während Zink auch durch andere Ionen (Kobalt, Quecksilber oder Cadmium) ersetzt werden kann. Die Cu,Zn-SOD sind sich in Struktur und Aminosäuresequenz sehr ähnlich. Die beiden anderen Superoxid Dismutase-Arten sind von diesen völlig abgelöst [Fridovich 1975].

In Knoblauch konnten drei verschiedene Superoxid Dismutasen nachgewiesen werden, SOD 1 ist eine Mn-SOD, SOD 2 und SOD 3 sind Cu,Zn-SODs [Hadji et al. 2007].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das vorliegende Enzym keine übliche Polyphenoloxidase ist. Polyphenoloxidasen enthalten normalerweise Kupfer als Cofaktor. Dieses Enzym jedoch wurde hauptsächlich von Zinkionen aktiviert. Es scheint sich also um eine seltene Polyphenoloxidase zu handeln. Die große Enzymgruppe, die von Kupfer und Zink aktiviert wird, sind die Cu,Zn-SODs. Eine Zugehörigkeit zu diesen kann aufgrund der Unterschiedlichkeit der Reaktionen die katalysiert werden und aufgrund der hohen Konserviertheit der Dismutasen ausgeschlossen werden. Zusätzlich werden diese von Kupferionen aktiviert, während

Zink nur die Aktivität erhöht. Das hier vorliegende Enzym wurde dagegen hauptsächlich durch Zinkionen aktiviert.

Möglicherweise war diese Aktivität nur eine Nebenaktivität, eine Art Artefakt und losgelöst von anderen Polyphenoloxidasen. Interessant ist, dass Polyphenoloxidasen in Pflanzen an der enzymatischen Bräunung beteiligt sind. Diese Reaktion wird ebenso wie die Bildung des Farbstoffes als Pflanzenabwehrmechanismus diskutiert.

Des Weiteren könnten die Polyphenole nicht die Hauptsubstrate der oxidativen Reaktion darstellen. Der Farbstoff und seine Derivate unterliegen Oxidationsreaktionen, die auch von dem Enzym katalysiert werden könnten.

#### 4.2.4.8 Charakterisierung der kinetischen Parameter der Bildung des Farbstoffes

Die Charakterisierung der Bildung des roten Farbstoffes stellte einen Summenparameter aus verschiedenen Reaktionen dar. Dieser umfasste sowohl enzymatische als auch nicht enzymatische Reaktionen. Die Alliinase-ähnliche Reaktion des Enzyms stellte einen Teilschritt dieser Reaktionskaskade dar. Der gebildete Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum von 515 nm. Die Reaktion konnte also UV-photometrisch bei 492 nm und 540 nm bestimmt werden. Die Geschwindigkeit der Reaktion war dabei direkt abhängig vom Anstieg der Absorption. Es wurden die relativen Aktivitäten für verschiedene Temperaturen, pH-Werte und Substratkonzentrationen ermittelt. Als Substrat wurde das natürliche Substrat der Reaktion, L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid, isoliert aus *A. rosenorum*, verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

Auffällig war die hohe relative Aktivität bei pH 11,0. Aus Umsetzungsversuchen des Precursors unter Zugabe von Natronlauge ist bekannt, dass der Precursor ohne Enzymzusatz im alkalischen ebenfalls zu einem roten Farbstoff reagiert (vgl. Kapitel 4.4). Es ist also davon auszugehen, dass der plötzliche Anstieg der Kurve nicht auf die Aktivität des Enzyms zurückzuführen war, sondern auf eine unspezifische Reaktion im alkalischen. Das eigentliche pH-Optimum lag also bei pH 7,5.

pH	492 nm		540 nm	
	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung
5	6,04	11,13	6,53	4,11
6	16,30	6,91	13,55	3,59
7,5	75,48	9,57	24,10	12,62
8	65,22	13,56	15,56	9,88

Temp [°C]	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung	rel. Aktivität [%]	Standard-abweichung
32	100,00	10,66	100,00	12,42
36	97,01	7,46		17,12
40	79,10	4,48		25,00

	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]	$K_m$ [mol/l]	$V_{max}$ [nkat/mg]
<b>Lineweaver-Burk</b>	$7,61 \cdot 10^{-6}$	$1,42 \cdot 10^{-3}$	$7,08 \cdot 10^{-6}$	$8,84 \cdot 10^{-4}$
<b>Hanes</b>	$1,01 \cdot 10^{-5}$	$1,52 \cdot 10^{-3}$	$1,13 \cdot 10^{-5}$	$9,73 \cdot 10^{-4}$

Tab. 4.10: Zusammenfassung der Bestimmung der kinetischen Parameter für die Bildung des Farbstoffes

Die Alliinase-ähnliche Aktivität bildete den enzymkatalysierten Schritt der Farbstoffbildung; daher bietet sich ein Vergleich der Verläufe der beiden pH-Optima an. Im Vergleich zur Alliinase-ähnlichen Aktivität zeigte die Kurve der Farbstoffbildung nur ein Maximum. Beide Kurven stimmten in ihrem Maximum bei pH 7,5 überein. Die Alliinase-ähnliche Aktivität hatte allerdings noch zwei weitere Maxima bei pH 5,0 und bei pH 10,0, die vermutlich auf Isoenzyme zurückzuführen waren. Für die Bildung des roten Farbstoffes war das zweite Maximum bei pH 5,0 nur noch schwach, das dritte Maximum bei pH 10 nicht mehr zu erkennen. Dies war vermutlich durch die Überlagerung der starken nicht-enzymatischen Reaktion bei pH 11,0 zu erklären. Vermutlich verliefen die anderen Reaktionsschritte bevorzugt bei pH 7,5, was zu einer

verstärkten Ausprägung des Maximums führte. Dadurch ergab sich für die Gesamtreaktion ein optimaler pH-Wert von pH 7,5. Eine weitere mögliche Erklärung war die Bevorzugung der Reaktion eines Isoenzym durch die weitere Farbstoffbildung. Vermutlich katalysierte jedes Isoenzym eine leicht unterschiedliche Reaktion und nur der Reaktionsschritt eines Isoenzym führte zu Bildung des Farbstoffes.

Das Temperaturoptimum der Farbstoffbildung lag bei 32°C. Weitere Maxima befanden sich bei 36°C und bei 40°C. Auch hier sollte die Abhängigkeit von der Temperatur mit der Alliinase-ähnlichen Aktivität verglichen werden. Das Optimum der Alliinase-Aktivität lag bei 36°C. Ein kleineres Maximum befand sich zwischen 20 und 22°C. Auch hier stimmte also jeweils ein Maximum überein, das wie beim pH-Optimum mit den weiteren Reaktionsschritten zur Bildung des Farbstoffes erklärt werden konnte.

Aus den relativen Aktivitäten für verschiedene Substratkonzentrationen konnte auch für die Bildung des Farbstoffes ein  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert berechnet werden. Hierbei handelte es sich um rein rechnerisch ermittelte Werte, die einen Summenparameter über alle Teilreaktionen darstellen. Die erhaltenen Daten wurden ebenfalls mit den kinetischen Parametern der Alliinase-ähnlichen Aktivität als einem Teilschritt der Reaktion verglichen. Die  $K_m$ -Werte in  $\mu\text{mol/l}$  sind in Abbildung 4.16 zusammengefasst.

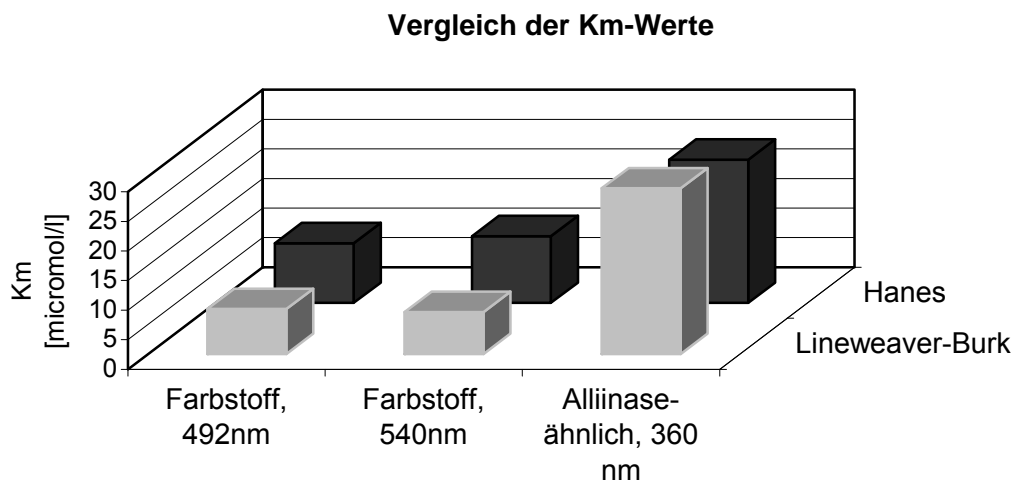


Abb. 4.16 Vergleich der  $K_m$ -Werte der Farbstoffbildung und der Alliinase-ähnlichen Aktivität

Es ist deutlich zu erkennen, dass die  $K_m$ -Werte für beide Reaktionen in der selben Größenordnung liegen. Sie befinden sich in beiden Fällen im unteren mikromolaren Bereich. Die Werte für die Farbstoffbildung sind etwas niedriger als diejenigen für die Alliinase-ähnliche Aktivität. Die Unterschiede sind allerdings gering. Die niedrigeren Werte stehen für eine höhere Substratspezifität im Falle der Farbstoffbildung. Dies ist zu erwarten, da es sich bei der Bildung des Farbstoffes um einen Summenparameter aus mehreren Reaktionen handelt. Die Alliinase-ähnliche Reaktion ist nur ein Teilschritt dieser komplexen Reaktion. Die niedrigen  $K_m$ -Werte lassen auf eine große Substratspezifität der folgenden Teilschritte schließen. Sie sind stark vom eingesetzten Precursor abhängig.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Farbstoffbildung sind sehr gering. Die  $V_{max}$ -Werte liegen bei  $1,42 \cdot 10^{-03}$  nkat/mg ( $8,84 \cdot 10^{-04}$  nkat/mg) nach Lineweaver-Burk, bzw.  $1,52 \cdot 10^{-03}$  nkat/mg ( $9,73 \cdot 10^{-04}$  nkat/mg) nach Hanes. Verglichen mit den Geschwindigkeiten der Alliinase-ähnlichen Reaktion (93,4, bzw. 84,34 nkat/mg) sind die Werte um den Faktor 10.000 bis 100.000 geringer. Dies zeigt, dass einer der nachfolgenden Reaktionsschritte zur Bildung des Farbstoffes geschwindigkeitsbestimmend ist. Hierbei könnte es sich um eine nichtenzymatische Reaktion handeln oder um eine Reaktion, die in vivo enzymatisch stattfindet, bei Abtrennung oder Inaktivierung des Enzyms aber auch langsamer in einer nichtenzymatischen Reaktion abläuft. Letzteres ist allerdings unwahrscheinlich, da die Bildung des roten Farbstoffes auch unter natürlichen Bedingungen in der Pflanze nicht schneller stattfindet als im Assay.

Eine Substratspezifität konnte für die Bildung des roten Farbstoffes nicht bestimmt werden, da die Reaktion komplex ist und vermutlich von verschiedenen Parametern abhängt. Es ist bis jetzt kein anderes Substrat bekannt, das zur Ausbildung eines roten Farbstoffes führt.

#### **4.2.5. Zusammenfassung der Enzymcharakterisierung**

Das isolierte Enzym ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 100-120 kDa zusammengesetzt aus Untereinheiten von 25 kDa und 31 kDa. Aus der N-terminalen Sequenzierung ergab sich keine Übereinstimmung mit bekannten Proteinen. Die meisten Ähnlichkeiten bestanden mit pflanzlichen Speicherproteinen. Es kann also



davon ausgegangen werden, dass das Protein eine Speicherfunktion besitzt oder der aktive Enzymteil an einen inaktiven Speicherproteinpart gebunden ist. Vermutlich handelte es sich um ein vegetatives Speicherprotein mit enzymatischer Aktivität. Das Enzym hatte zwei Hauptfunktionen, eine Alliinase-ähnliche Aktivität, die zur Ausbildung eines roten Farbstoffes führte und eine Polyphenoloxidase-Aktivität. Die Alliinase-ähnliche Aktivität zeigte eine hohe Substratspezifität zu dem natürlichen Substrat S-Pyrrolylcysteinsulfoxid. Daneben wurden auch andere Cysteinsulfoxide umgesetzt. Die Alliinase-ähnliche Aktivität benötigte PLP als Cofaktor für die Reaktivität, wie für CS-Lyasen typisch. Die Aktivität konnte mit Aminooxyacetat vollständig inhibiert werden. Für die Polyphenoloxidase-Aktivität war kein natürliches Substrat und keine natürliche Funktion bekannt. Verschiedene Polyphenole wurden als Substrat akzeptiert. Aus den Versuchen konnte auf eine ortho-Polyphenoloxidase geschlossen werden. Durch Zusatz von EDTA war eine komplette Inhibierung der Aktivität nicht möglich. Ein Zusatz von Zinkionen zu den teilweise inhibierten Extrakten führte zu einer Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität. Durch die Zugabe von Kupferionen konnte eine leichte Aktivitätssteigerung erreicht werden, aber keine vergleichbar hohe Aktivität wie durch Zinkionen. Die meisten pflanzlichen Polyphenoloxidasen werden im Gegensatz hierzu von Kupferionen aktiviert. Diese ungewöhnliche Aktivierung der Polyphenoloxidase lässt darauf schließen, dass es sich um eine Nebenaktivität handelte. Möglicherweise war diese Funktion ein Artefakt, und die Aktivität hat in der Pflanze keine Funktion mehr. Als natürliche Substrate kommen Flavonoide, wie Quercetin in Frage. Daneben könnte das Enzym allerdings auch für die Oxidation des Farbstoffes und seiner Derivate verantwortlich sein.

### 4.3 Bildung des roten Farbstoffes

Als Reaktionsprodukt des Pyrrolylcysteinsulfoxides mit dem Alliinase-ähnlichen Enzym entstand ein rot gefärbtes Produkt, welches ebenfalls näher untersucht wurde. Die Reaktion trat in der Pflanze nach einer Verletzung des Zellmaterials auf (Abb. 4.17) und konnte an allen oberirdischen und unterirdischen Pflanzenteilen wie Blätter, Stängel und Zwiebel beobachtet werden. Zunächst verfärbte sich das Material orange-rot und wurde dann langsam dunkelrot. Lange gelagerte, trockene Extrakte und altes, getrocknetes Pflanzenmaterial verfärbten sich nach längerer Zeit (Monate bis Jahre) grünlich.

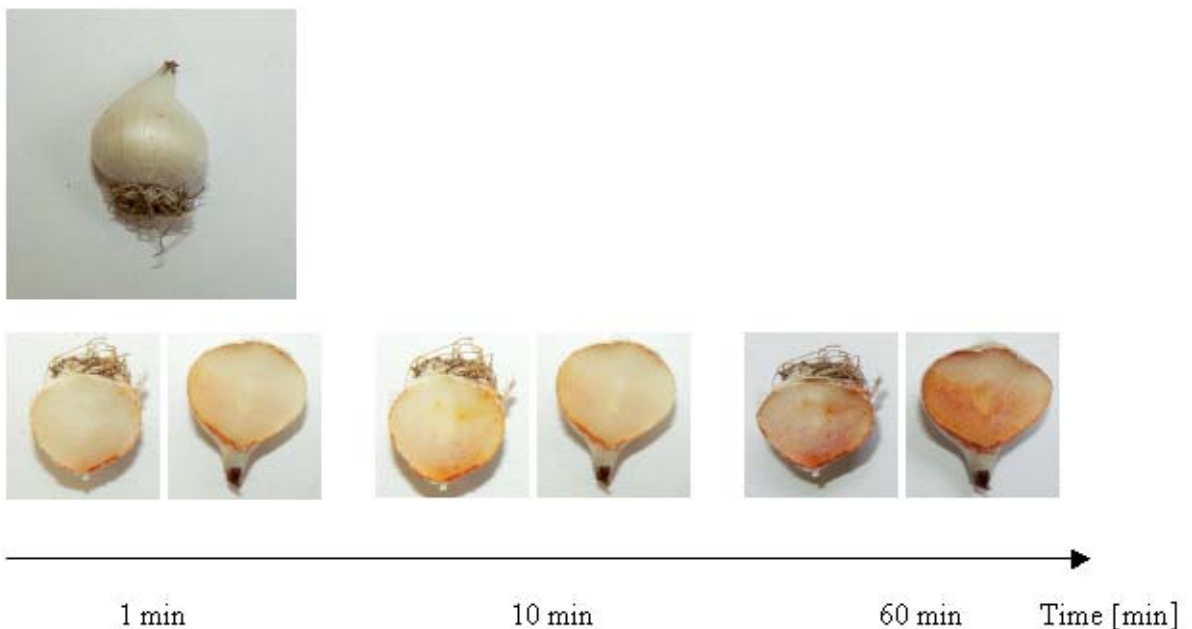


Abb. 4.17 Bildung des Farbstoffes nach dem Aufschneiden einer Zwiebel. Die unbeschädigte Zwiebel ist ungefärbt, direkt nach dem Anschneiden tritt an der Schnittfläche bereits eine leichte orange-rote Verfärbung auf. Innerhalb von 60 Minuten entsteht mehr Farbstoff, der sich dunkler rot verfärbt

#### 4.3.1. Identifizierung des Farbstoffes

Der Farbstoff, der bei der enzymatischen Reaktion des neu isolierten Enzyms mit dem S-Pyrrolylcysteinsulfoxid entstand, konnte von Jedelská [2007] für *A. giganteum* charakterisiert werden (Abb. 4.18). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich den Farbstoff aus *A. macleanii* oder *A. rosenorum* zu isolieren. Die

massenspektrometrischen Daten weisen allerdings auf denselben Farbstoff hin. Die Fragmentierungsmuster stimmten mit der Struktur des Dithiodipyrrols überein. Zusätzlich konnte ein Vergleich der HPLC Retentionszeiten und der UV-Spektren diese These unterstützen. Das Dithiodipyrrol konnte in Extrakten von *A. giganteum*, *A. rosenorum*, *A. jesdianum* und *A. macleanii* nachgewiesen werden. Neben dem bekannten Farbstoff enthielten die Extrakte eine Vielzahl anderer Substanzen. Dies ist aufgrund der bekannten Instabilität und Reaktivität der farbgebenden Komponenten nicht überraschend.

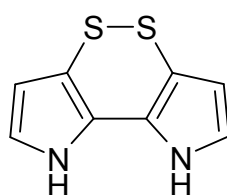


Abb. 4.18 Farbstoff aus Arten des Subgenus *Melanocrommyum*: Dithiodipyrrol

#### 4.3.2 Biosynthese des Farbstoffes

Der erste Schritt der Bildung des roten Farbstoffes war eine Alliinase-ähnliche Reaktion. Diese trat erst bei einer Beschädigung des Zellgewebes ein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Enzym und die Vorläufersubstanz, das Pyrrolylcysteinsulfoxid, in verschiedenen Kompartimenten der Zelle vorliegen. Hierfür sprach auch die Stabilität des isolierten Substrates und seine relativ hohe Konzentration in enzyminaktivierten Extrakten. Die erste Stufe der Bildung des Farbstoffes war demnach eine Reaktion, die analog des Abbaus der Cysteinsulfoxide durch Alliinase in anderen *Allium*-Spezies verläuft. Hier konnte die räumliche Trennung des Enzyms von den Substraten nachgewiesen werden. Dadurch tritt die Reaktion auch hier zwischen beiden Komponenten erst nach Beschädigung des Gewebes ein. Eine Vielzahl der unterschiedlichsten, schwefelhaltigen aromawirksamen Verbindungen resultiert daraus. Diese sind für das charakteristische Aroma der *Allium*-Arten verantwortlich. Es entstehen zunächst die hochreaktiven Sulfonsäuren, die miteinander zu Thiosulfinaten reagieren. Diese sind für das Aroma von frischem Knoblauch und Zwiebeln verantwortlich. In einer Reihe von weiterführenden Schritten entstehen eine Vielzahl von weiteren Aromaverbindungen. Diese weiteren Produkte sind abhängig von der Spezies, den darin enthaltenen Cysteinsulfoxiden und der

Behandlung der Extrakte. Weitere entscheidende Faktoren sind Temperatur, pH-Wert oder Lösungsmittel.

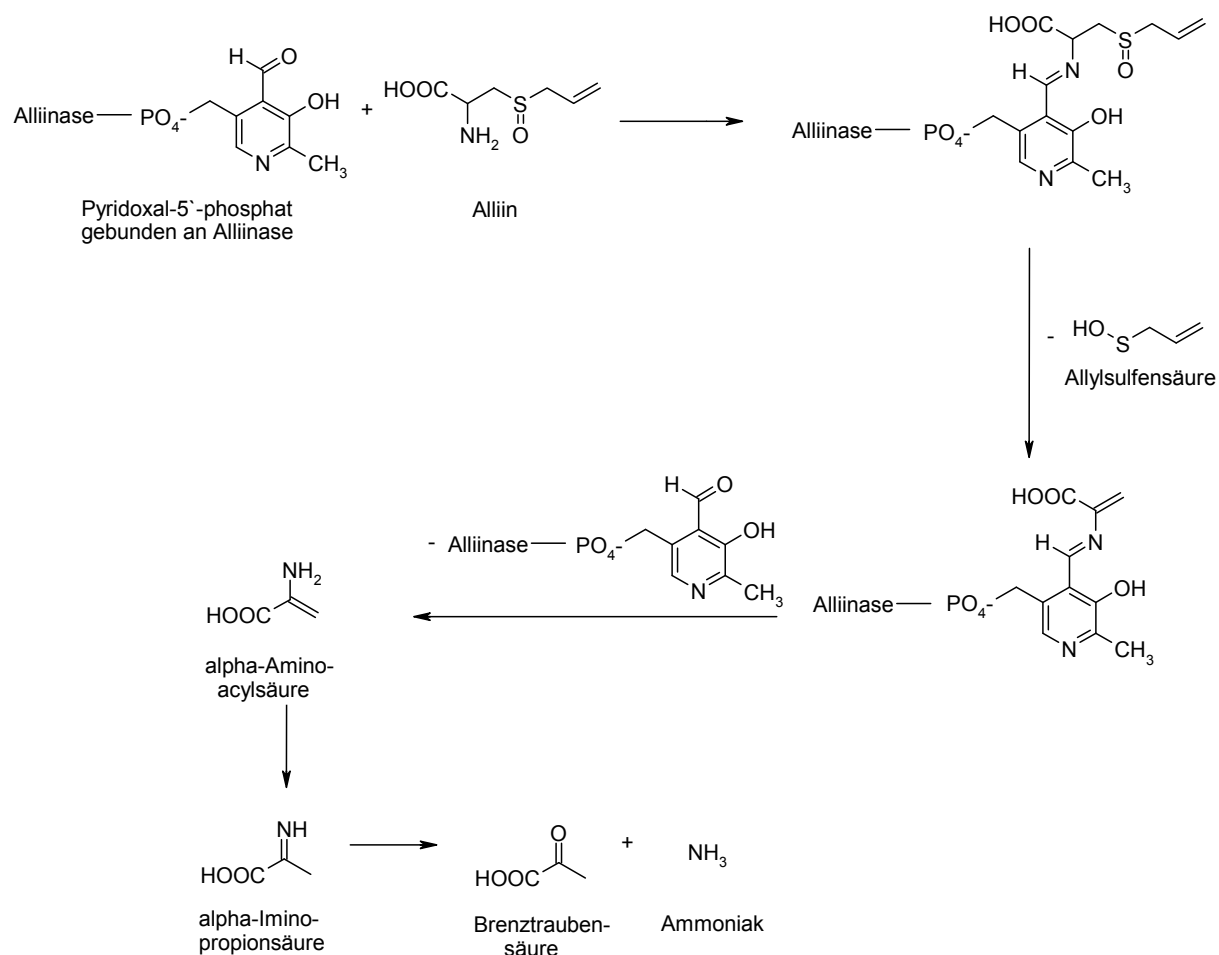


Abb. 4.19: Mechanismus der enzymatischen Reaktion der Cysteinsulfoxide am Beispiel Alliin. Die Produkte dieser ersten Reaktion sind Sulfensäure, Pyruvat und Ammoniak (nach Jansen, 1989)

Der Mechanismus der katalytischen Umwandlung der Cysteinsulfoxide in die korrespondierenden Sulfensäuren konnte 1989 von Jansen et al. aufgeklärt werden (Abb. 4.19). Hierbei erfolgt zunächst eine kovalente Bindung des Cysteinsulfoxides an das Pyridoxal-5'-Phosphat der Alliinase (s. Kapitel 1.3.2). Die Ausbildung dieser Schiff'schen Base wird begünstigt durch die basischen Gruppen sowie durch die positiven und negativen Aminosäurereste an der Oberfläche der enzymatischen Bindungstasche. Sie können in Wechselwirkung mit den funktionellen Gruppen der

Cysteinsulfoxide treten und diese somit in die richtige Position für die Bindung zwingen. Hierdurch wird auch das Zwischenprodukt stabilisiert. Durch beta-Elimination entstehen die beiden sehr instabilen Produkte,  $\alpha$ -Iminopropionsäure und Sulfensäure.  $\alpha$ -Iminopropionsäure hydrolysiert spontan zu Pyruvat und Ammoniak. Die Sulfensäure kondensiert sofort zu Thiosulfinat (Abb. 4.20).

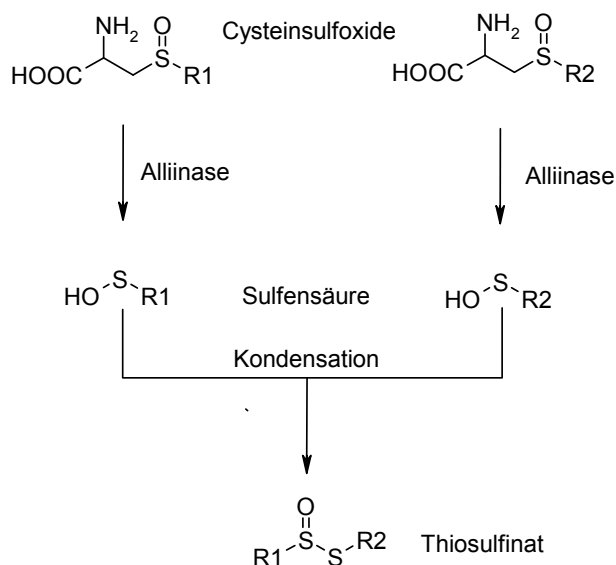


Abb. 4.20: Kondensation der aus Cysteinsulfoxiden entstandenen Sulfensäuren zu Thiosulfinaten

Die Bildung der Thiosulfinate wurde von Shen anhand von Modellsystemen untersucht [Shen und Parkin 2000, Shen et al. 2002]. Diese Studie zeigt, dass die Hydrolyse der einzelnen Cysteinsulfoxide mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abläuft. In der Reihe Isoalliin, Alliin, Propiin, Ethiin und Methiin nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit ab. Außerdem konnte anhand dieser Studie bewiesen werden, dass die Thiosulfinate mit Sulfensäuren reagieren können. Aus unterschiedlichen symmetrischen Thiosulfinaten bildet sich so schnell ein Gleichgewicht aus den entsprechenden asymmetrischen Produkten, während Erhitzen zur Bildung von symmetrischen Thiosulfinaten führt. Beide Reaktionen verlaufen über Sulfensäuren als Zwischenstufen [Block 1992]. Thiosulfinate, die nur 1- und 2-Propenylgruppen enthalten, werden etwa zehn mal schneller gebildet als jene, die Methylgruppen enthalten. Zusätzlich disproportionieren Thiosulfinate leicht. So entsteht aus Methylmethanthiosulfinat Dimethyldisulfid ( $\text{CH}_3\text{SSCH}_3$ ) und Methylmethanthiosulfonat ( $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{SCH}_3$ ).

Die Zusammensetzung der Thiosulfinate ist demnach direkt abhängig von der Zusammensetzung der Cysteinsulfoxide. Das Cysteinsulfoxid-Muster variiert nicht nur zwischen den Arten, sondern auch innerhalb einer Spezies. Es ist abhängig vom untersuchten Pflanzenteil, wie Zwiebel, Wurzel oder Blätter. Weiterhin wirken sich Faktoren wie Entwicklungsstadium, Anbau- und Lagerbedingungen auf die Zusammensetzung aus.

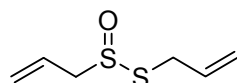


Abb. 4.21: Struktur von Allicin

Allicin wurde als erstes Thiosulfinat 1948 von Stoll und Seebeck aus Knoblauch isoliert (Abb. 4.21). Es ist vermutlich das am besten untersuchte Thiosulfinat aus *Allium*-Arten.

Besonders reaktives Verhalten zeigen Arten, die Isoalliin enthalten, wie z. B. die Küchenzwiebel (*A. cepa*). Hierbei reagiert die als Zwischenprodukt entstehende 1-Propenylsulfensäure in einer schnellen Reaktion weiter zu Propanthial-S-oxid (Abb. 4.22). Diese Substanz wirkt stark tränenreizend und ist daher als Tränenfaktor (lachrymatory factor) bekannt.

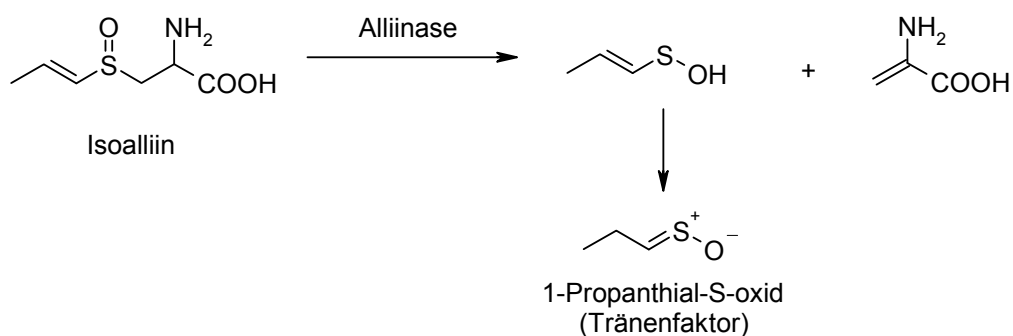


Abb. 4.22: Bildung des Tränenfaktors (1-Propanthial-S-oxid) aus Isoalliin

Aus diesen Erkenntnissen zur Biosynthese der primären Aromastoffe in anderen *Allium*-Arten lassen sich aufgrund der Ähnlichkeiten der enzymkatalysierten Reaktionen Rückschlüsse auf die Reaktionen in den untersuchten Arten des Subgenus *Melanocrommyum* ziehen.

In diesen konnten zwei Cysteinsulfoxide nachgewiesen werden: Methiin und das neu isolierte Pyrrolylcysteinsulfoxid. Bei einer Beschädigung des Zellgewebes findet vermutlich zunächst eine Umsetzung der Cysteinsulfoxide durch das neu isolierte

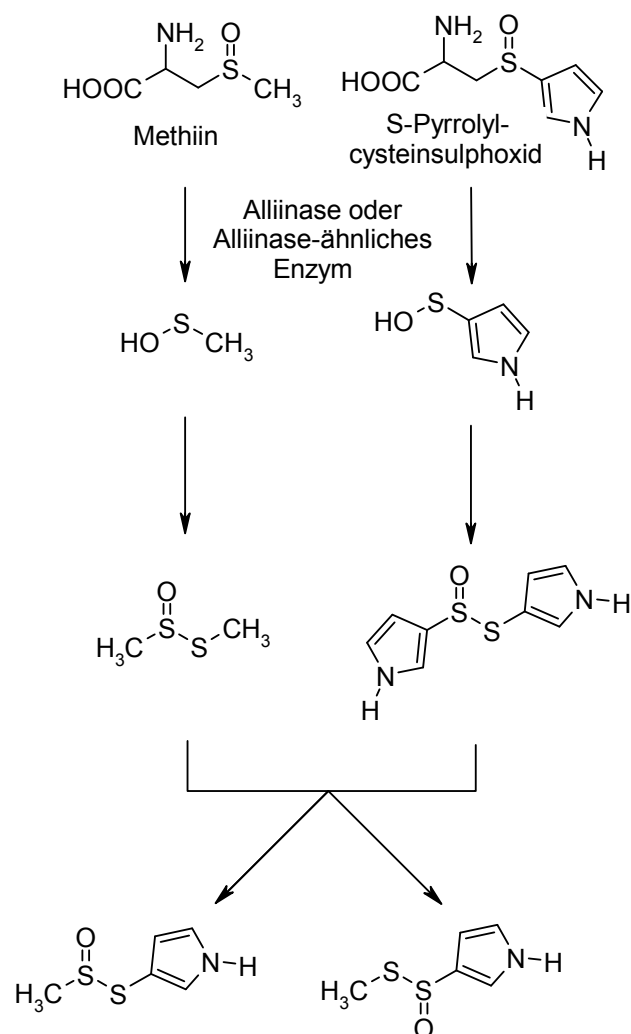


Abb. 4.23: Bildung der Sulfensäuren und der Thiosulfinate in Arten des Subgenus *Melanocrommyum*

Allinase-ähnliche Enzym statt. Die instabilen Zwischenprodukte Methylsulfensäure und Pyrrolylsulfensäure sind so instabil, dass sie sofort zu Thiosulfinaten kondensieren. Entsprechend konnten diese Zwischenprodukte nicht nachgewiesen werden. Die entstehenden symmetrischen Thiosulfinate reagieren miteinander über die Bildung von Sulfensäuren als Zwischenstufe zu den entsprechenden asymmetrischen Thiosulfinaten (Abb. 4.23). Auch diese Thiosulfinate konnten nicht nachgewiesen werden. Das entstehende Dimethylsulfoxid ist sehr instabil. Dipyrrolylthiosulfinat reagiert vermutlich in einer schnellen Reaktion unter Abspaltung von Wasser in das stabilere Dithiodipyrrol. Vermutlich ist die Reaktion sehr schnell, so dass nur noch der Farbstoff, allerdings nicht mehr das entsprechende Thiosulfinat

nachzuweisen war. Dementsprechend steht dieses auch nicht mehr zu Verfügung um asymmetrische Thiosulfinate (Methyl-Pyrrolylthiosulfinat) zu bilden. Denkbare Folgereaktionen der Thiosulfinate sind die weitere Oxidation zum Disulfinat oder Reduktion zum entsprechenden Disulfid. Allerdings konnten auch hier die entsprechenden Produkte nicht nachgewiesen werden. Diese Reaktionen fanden also nicht statt, bzw. die entsprechenden Produkte reagierten schnell weiter.

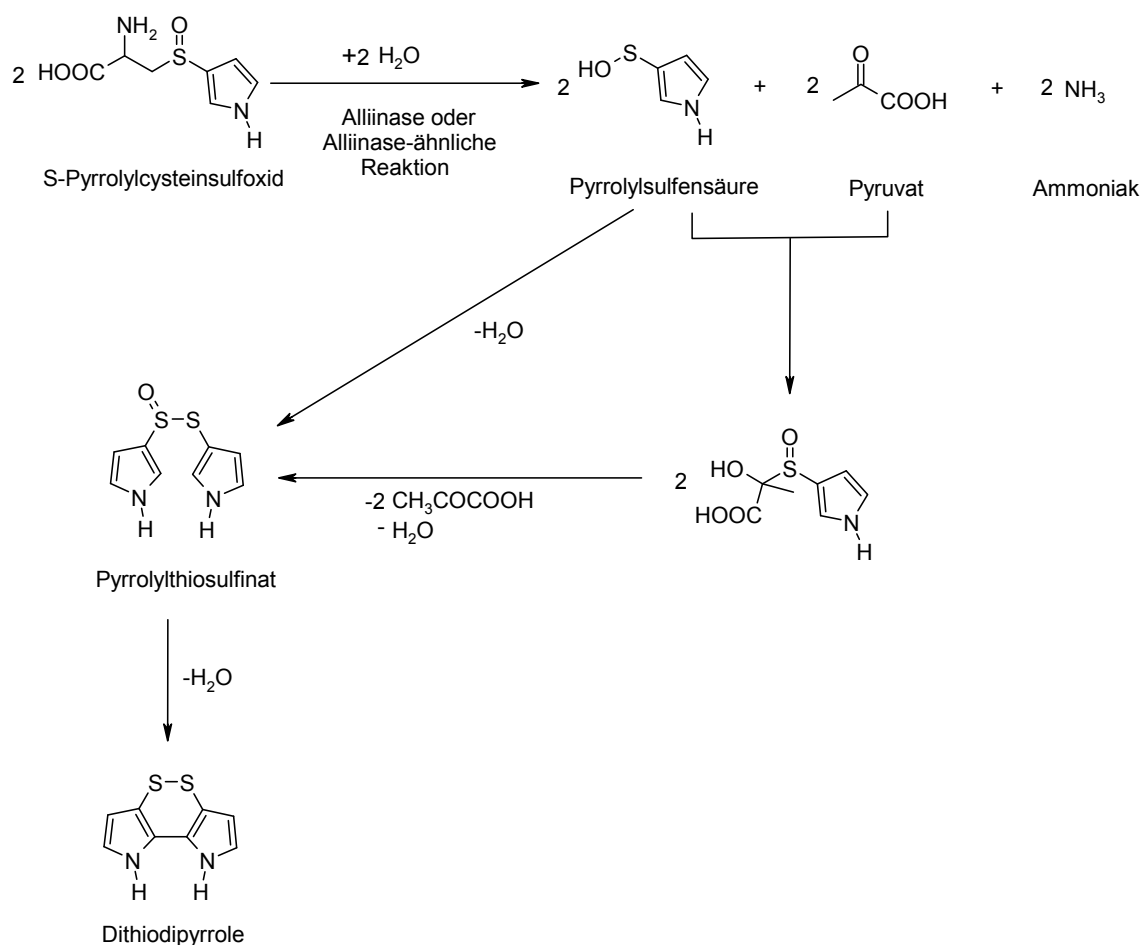


Abb. 4.24: Mögliche Biosynthese des Dithiodipyrrols aus S-Pyrrolylcysteinsulfoxid (nach Jedelská, 2007)

Diese Überlegungen unterstützen das von Jedelská postulierte Biogeneseschema (Abb. 4.24). Die Ausgangssubstanz, das Pyrrolylcysteinsulfoxid konnte nun ebenfalls nachgewiesen und isoliert werden. Dieses reagiert katalysiert durch die Alliinase-ähnliche Reaktion des neu isolierten Enzyms zunächst zu Pyrrolylsulfensäure, Pyruvat und Ammoniak. In einem nächsten Schritt kann die Sulfensäure direkt zum Pyrrolylthiosulfinat reagieren oder mit Pyruvat zu dem Sulfoxid in Abbildung 4.24 kondensieren. Dieses Kondensationsprodukt wurde von Jedelská in Extrakten nachgewiesen und war immer von unidentifizierten Zuckern begleitet. Das Pyrrolylthiosulfinat reagiert spontan unter Verlust von Wasser zum Dithiodipyrrol. Zusätzlich war der Nachweis für die Bildung des Dithiodipyrrols in weiteren Arten des



Subgenus *Melanocrommyum* möglich (*A. maclearii*, *A. rosenorum*, *A. jesdianum*), auch wenn dieses aus diesen Materialien nicht isoliert werden konnte.

Die beschriebenen Ergebnisse liefern auch eine Erklärung für die Reaktion der farblosen, enzyminaktivierten Extrakte mit Alliinase Rohextrakten aus *A. sativum* und *A. cepa*. Der erste Reaktionsschritt entspricht der von Alliinase katalysierten  $\beta$ -Elimination von Cysteinsulfoxiden. Alliinasen aus unterschiedlichen Pflanzenextrakten unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität. So wird von Alliinase aus *A. sativum* Alliin am besten umgesetzt, während Alliinase aus *A. cepa* Isoalliin besser umgesetzt. Alle bisher nachgewiesenen Alliinasen reagieren mit Cysteinsulfoxiden in unterschiedlichen Umsetzungsraten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese beiden Enzyme auch das Pyrrolylcysteinsulfoxid umsetzen. Diese Reaktion wäre vermutlich langsamer als bei dem entsprechenden Enzym aus den Subgenus *Melanocrommyum*-Arten, was allerdings bei der optischen Betrachtung nicht von Bedeutung wäre. Die nachfolgende Reaktion der Sulfensäuren zu Thiosulfinaten und die Abspaltung von Wasser aus dem Dipyrrolylthiosulfinat würde dann in beiden Fällen analog verlaufen.

Für N-Oxide ist ein thermaler Reaktionstyp bekannt, welcher der Umwandlung des Sulfoxides zum Sulfenat sehr ähnlich ist. Diese Cope Elimination läuft über einen fünfgliedrigen Ring als Zwischenstufe [DePuy und King 1960, Jursic 1997] und führt zu Olefinen. Dies könnte erklären, warum die Reaktion auch nach Inaktivierung der Enzyme unter bestimmten Bedingungen abläuft. So führte auch ein Erhitzen des Materials oder ein alkalisches Milieu zur Bildung eines roten Farbstoffes. Der für diese Reaktionen postulierte, der Cope Elimination ähnliche Mechanismus, ist in Abbildung 4.25 dargestellt.

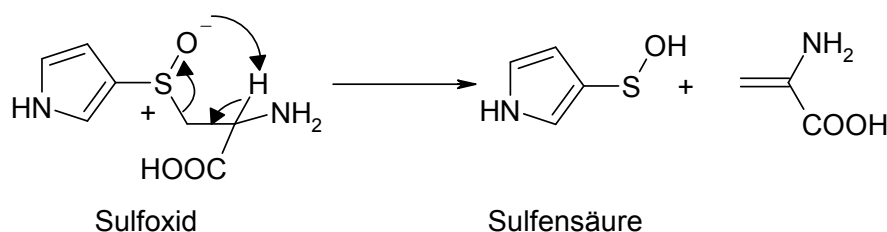


Abb. 4.25 Möglicher Mechanismus der Bildung der Sulfensäure ohne Enzym, in Anlehnung an die Cope Elimination

Neben dem in Abbildung 4.24 wiedergegebenen postulierten Biogeneseweg ist also unter bestimmten Bedingungen auch ein anderer Mechanismus denkbar. Unter erhöhten Temperaturen und möglicherweise auch im alkalischen werden Sulfensäuren wohl auch über eine Cope Elimination gebildet. Bisher wurde allerdings unter natürlichen Bedingungen in der Pflanze nur nach Verletzung der Zellen und damit nach Freisetzung der Enzyme eine Rotfärbung festgestellt. Der in Abbildung 4.24 angegebene Biosyntheseweg findet also vermutlich unter natürlichen Bedingungen statt, während der enzymatische Schritt unter extremeren Bedingungen wie Hitze oder alkalischen pH-Werte umgangen werden kann.

So konnte der Farbstoff mittels HPLC-MS und MS/MS Messungen auch in enzyminaktivierten Extrakten nachgewiesen werden, die entweder mit Alliinase aus Knoblauch versetzt wurden oder deren pH-Wert ins basische verschoben wurde.

#### **4.3.3 Funktion des Farbstoffes**

Über die natürliche Funktion des Farbstoffes und seiner Vorläufer war bisher noch nichts bekannt. Der Stellenwert von Pyrrolverbindungen in der Natur sind sehr hoch und diese sind an vielfältigen Prozessen beteiligt [Walsh et al. 2006]. Vorstellbar ist hier eine Funktion zur Verteidigung der Pflanze gegen Frassfeinde, Bakterien, Pilze oder sonstige Pathogene.

Der rote Farbstoff in den Zwiebeln wird hauptsächlich in den Zellen gebildet, die die Leitbündel umgeben [Jedelská 2007]. Die Leitbündel haben eine wichtige Funktion bei der Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen. Bei einer Schädigung des Zellgewebes ist das beschädigte Gewebe normalerweise sehr anfällig gegen äußere Schadeinwirkungen. So kann es leicht zu Infektionen durch Pilze oder Bakterien kommen. Erreichen diese die Leitbündel, können die Schädlinge in alle Bereiche der Pflanze gelangen und diese systematisch schädigen. Für die Pflanze ist folglich ein Schutz der Leitbündel besonders wichtig. Jedelská konnte bereits die besonders hohe Konzentration des Farbstoffes in den äußeren Bereichen der Zwiebel und um die Leitbündel zeigen. Demnach muss auch die Konzentration des Precursors in diesen Bereichen besonders hoch sein. Der ermittelte Gesamtgehalt des Cysteinsulfoxides in der Zwiebel beträgt etwa 0,01%, er sollte also in bestimmten Bereichen der Zwiebel sehr viel höher sein. In den Zellen, welche die Leitbündel umgeben, sollte die Precursorkonzentration mindestens 10fach höher sein. Dies ergibt sich aus einem Vergleich der Substanzmenge, die die Leitbündel umgibt, mit der Gesamtmasse der

Zwiebel. Eine mögliche Schutzfunktion einer der Substanzen aus der Biosynthese ist daher vorstellbar. Extrakte der Arten des Subgenus *Melanocrommyum* weisen eine hohe antioxidative Kapazität auf, der allerdings noch keine Substanz oder Substanzklasse zugeordnet werden konnte. Die antioxidativen Eigenschaften des Farbstoffes selbst sind gering [Jedelská 2007], so dass hierfür die Substanzen aus der Biosynthese des Farbstoffes in Betracht kommen.

Besonders die strukturelle Ähnlichkeit der Substanzen mit der Familie der Prodigiosine ist im Zusammenhang mit möglichen Wirkungen der neuen Pyrrolverbindungen interessant. Diese Substanzen, die von gewissen Bakterien und Actinomyceten der Genera *Serratia* und *Streptomyces* gebildet werden, sind sehr gut untersucht. Diese Mikroorganismen wachsen auf stärkehaltigen Medien in roten Kolonien, die sich in einigen Fällen auch verflüssigen. Aus diesem Grund werden diese Mikroorganismen und ihre rot gefärbten Prodigiosine mit zahlreichen Fällen von „blutendem“ Brot und anderen Lebensmitteln, sowie Hostien in Verbindung gebracht. Diese Fälle werden bereits seit Jahrtausenden berichtet, mit besonders vielen Erwähnungen im Mittelalter. Prodigiosin konnte aus *S. marcescens* isoliert werden und stellt dessen wichtigsten sekundären Metabolit dar. Später konnten eine Vielzahl verwandter Verbindungen mit demselben Pyrrolylpyrrolmethan Grundgerüst, das im weiteren als Prodiginin Gerüst bekannt wurde (Abb. 4.26), nachgewiesen werden. Diese Verbindungen zeigen ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien, Pilze und Protozoen. Zusätzlich lösen sie in verschiedenen menschlichen Krebszellen Apoptose aus, ohne die gesunden Zellen zu beeinflussen [Yamamoto et al. 1999, 2000, Diaz-Ruiz et al. 2001, Montaner et al. 2000, 2001]. Zugleich konnte aber auch eine zytotoxische und immunsuppressive Wirkung nachgewiesen werden.

Prodigiosine scheinen ihre zytotoxische Aktivität zumindest teilweise durch die Bildung von Kupfer-(II)-Komplexen, die über drei Stickstoff Atome koordiniert sind, zu erhalten [Park et al. 2003]. Ähnliche aber schwächere Wirkung zeigen die strukturell sehr ähnlichen Tambjamine (Abb. 4.26). Diese werden hauptsächlich von marinen Organismen wie *Nudibranchia*, *Bryozoa* oder *Ascidacea* Spezies gebildet und sollen an der Verteidigung vor Feinden beteiligt sein [Kazlauskas et al. 1982, Carté und Faulkner 1983, Lindquist et al. 1991].

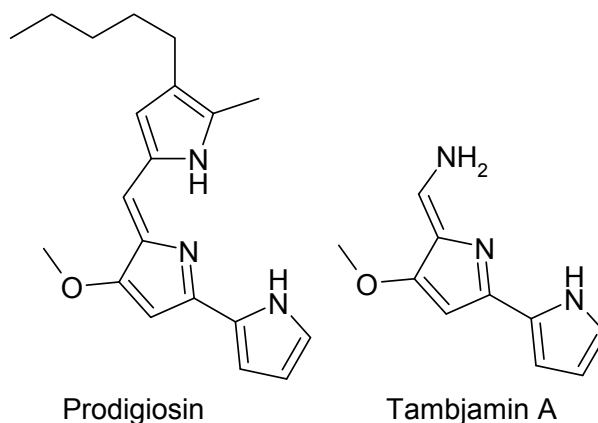


Abb. 4.26: Struktur von Prodigiosin und Trambjamine A

Eine ähnliche Wirkung über die Bildung von Kupfer-(II)-Komplexen ist auch im Fall des Dithiodipyrrols und seiner pyrrolhaltigen Vorläufersubstanzen möglich.

#### 4.4 weitere Substanzen in Farbstoffextrakten

Neben dem Dithiodipyrrol entstanden bei der Verletzung des Zellgewebes der Zwiebeln eine Vielzahl weiterer Verbindungen. Diese ergaben sich zum einen aus der Instabilität des Farbstoffes. Zum anderen traten Neben- und Folgereaktionen auf. Einige Produkte wurden mit massenspektroskopischen Messungen näher untersucht. Aufgrund der Vielzahl und der hohen Instabilität vieler dieser Verbindungen war eine Isolierung nicht möglich.

##### 4.4.1 Polymerisationsprodukte des Farbstoffes

Der Farbstoff war instabil und unterlag vielen Reaktionen. Vor allem kam es hierbei zu Polymerisationen. Wie in Abbildung 4.27 dargestellt, bildeten sich vermutlich zunächst die linearen Polymere, dann kam es aber auch zum Ringschluss.

Problematisch war hierbei die sinkende Löslichkeit in Lösungsmitteln mit steigendem Polymerisationsgrad. Die höheren Polymere konnten nicht nachgewiesen werden. Nur das Dimer und das ringförmige Tetramer wurden in Spuren mittels HPLC-MS detektiert. Aufgrund der geringen Konzentration war eine Überprüfung der Strukturen mittels MS/MS Experimenten nicht möglich. Die nur geringen Mengen waren zum

einen mit der geringen Löslichkeit, zum anderen aber auch mit der schlechter werdenden Ionisierbarkeit zu erklären.

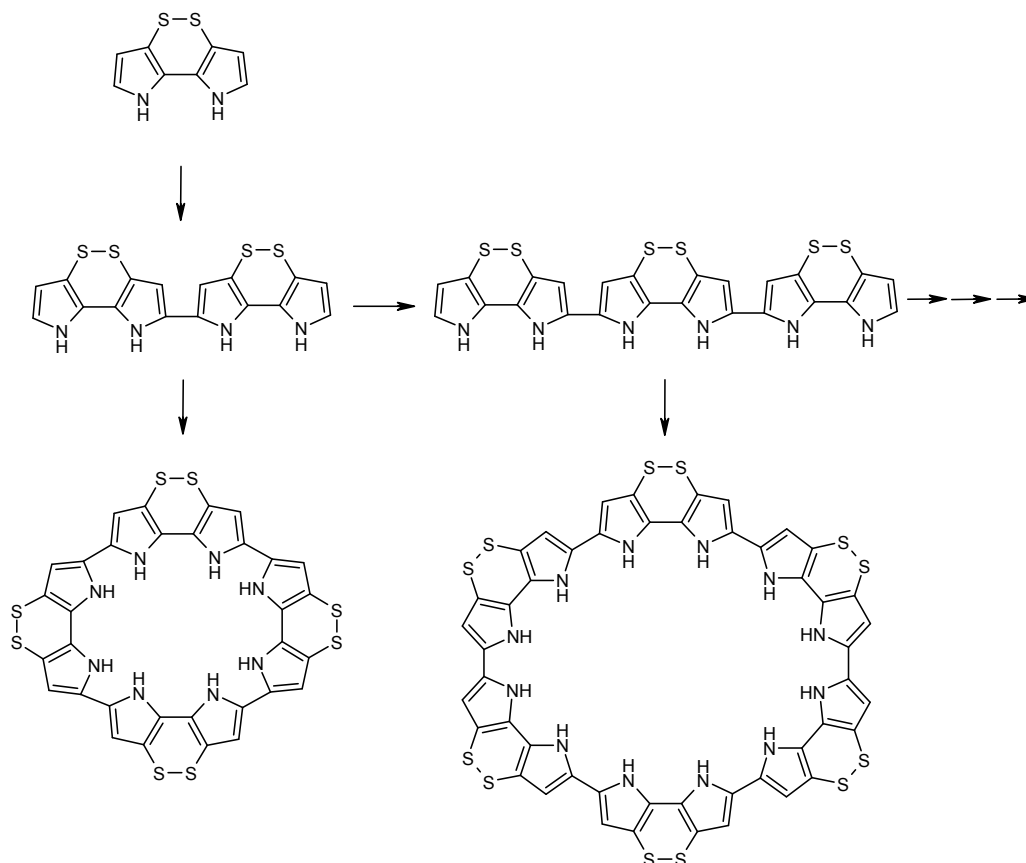


Abb. 4.27: Polymerisation des Dithiodipyrrols

Besser nachzuweisen waren dagegen die oxidierten Formen, von denen einige Substanzen detektiert werden konnten. So waren neben dem Dimer auch die in Abbildung 4.28 angegebenen oxidierten Formen nachzuweisen. Diese könnten durch eine Reaktion des Dithiodipyrrols mit Dipyrrolthiosulfat oder durch Oxidation nach Bildung des Dimer entstehen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das Alliinase-ähnliche Enzym das an der Bildung des Farbstoffes beteiligt ist, eine Polyphenoloxidase-Nebenaktivität aufweist. Die natürliche Funktion dieser Aktivität ist nicht bekannt. Möglicherweise ist dieses Enzym auch an der Oxidation der Farbstoffmoleküle beteiligt. Die eigentliche Nebenfunktion wäre demnach eine Oxidase-Aktivität. Polyphenole würden hier ebenfalls als Substrate erkannt werden.

Hierfür spricht auch die für Polyphenoloxidasen ungewöhnliche Abhängigkeit der Aktivität von Zinkionen.

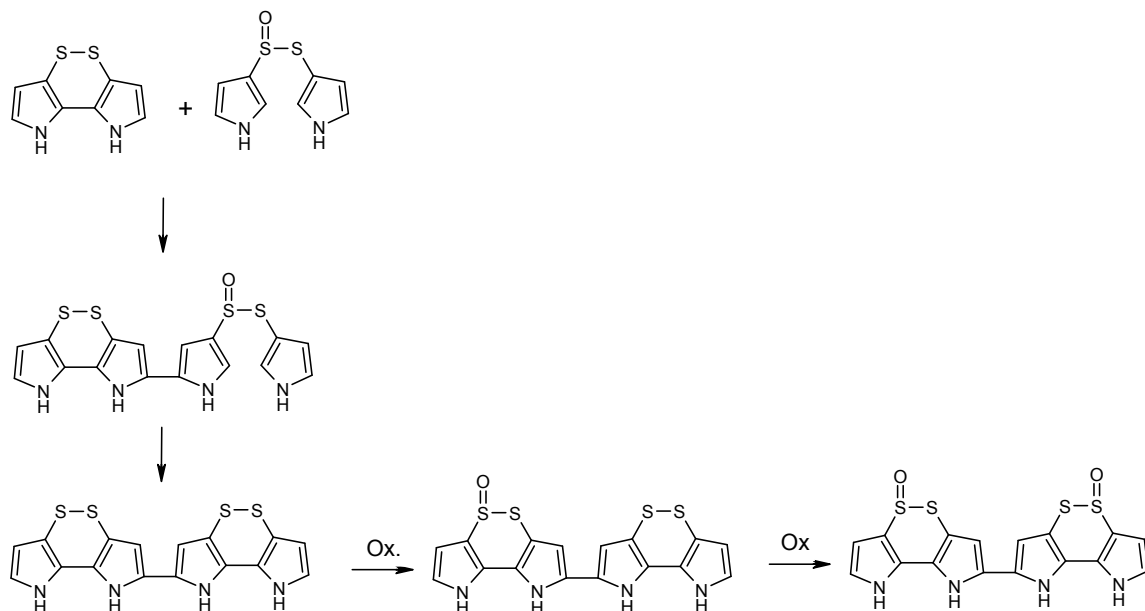


Abb. 4.28: Bildung der oxidierten Farbstoffpolymere

#### 4.4.2 Bildung von Polysulfiden

In den Extrakten konnten einige Polythiodipyrrole sowie deren Oxide und auch Dimere nachgewiesen werden. Die Strukturen ergaben sich aus den Fragmenten der MS/MS Messungen.

Polysulfide in *Allium*-Arten wurden meist als Artefakte der Analytik angesehen und werden erst in den letzten Jahren untersucht. In Knoblauch (*A. sativum*) wurden beispielsweise Diallyltrisulfide und Diallyltetrasulfide nachgewiesen, die als weitere Abbauprodukte des Allicins angesehen werden können. Diese waren vor allem in gealterten Knoblauchextrakten nachzuweisen. Die Zusammensetzung schwankt bei diesen Produkten stark und ist abhängig von der Herstellung der Extrakte. Die Polysulfide haben ein sehr breites Wirkungsspektrum, von antioxidativ und antibakteriell zu antifungal und antimikrobiell [Münchberg et al. 2007]. Die antibiotische Aktivität scheint allerdings mit der Anzahl der Schwefelatome zu steigen, wobei der Anstieg zwischen den niederen Derivaten höher erscheint als zwischen den höheren

[Horie et al. 1992]. Diallylpenta- oder Diallylhexasulfide sind allerdings bisher kaum untersucht worden [Münchberg et al. 2007].

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für Alliinase aus *A. cepa* eine Cystin-Lyase Nebenaktivität festgestellt werden konnte [Lancaster et al. 2000]. Die Cystin-Lyase Aktivität ist typisch für *Brassicaceae*-Spezies [u.a. Hamamoto und Mazelis 1986, Ukai und Sekiya 1999]. Wie auch Alliinase gehört dieses Enzym zu den CS-Lyasen und katalysiert eine ähnliche Reaktion wie die Cystathion- $\beta$ -lyase (EC 4.4.1.8).

Die Produkte der enzymatischen Umwandlung sind äquimolare Mengen Thiocystein, Pyruvat und Ammoniak [Ukai und Sekiya 1999]. Thiocystein ist sehr instabil und zerfällt in Cystein und elementaren Schwefel. Während neben Cystin auch einige Cysteinsulfoxide von dem Enzym umgesetzt werden, wird Cystein nicht umgewandelt [Ukai und Sekiya 1999].

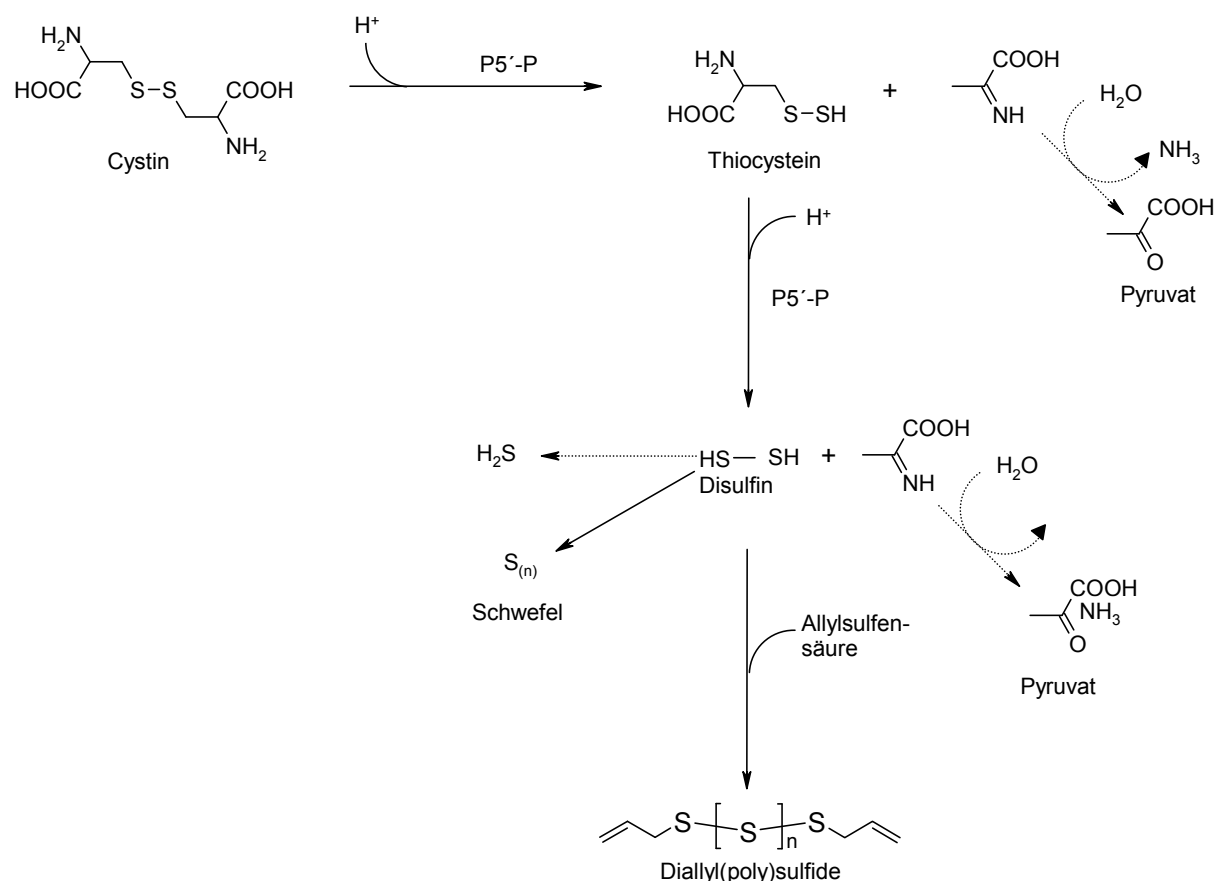


Abb. 4.29: Cystin-Lyase Nebenaktivität der Alliinase: vermutete Reaktion zur Bildung von Disulfid, das im Anschluss mit Allylsulfensäuren zu Diallylpolysulfiden reagieren kann (nach Keusgen, 2008)

Die Nebenaktivität der Alliinase unterscheidet sich von anderen beschriebenen Cystin-Lyasen und scheint einen anderen Reaktionsmechanismus aufzuweisen. Bei der Inkubation von Cystin mit Cysteinsulfoxiden und Alliinase entsteht hauptsächlich Diallyl, Di-, Tri- und Tetrasulfide sowie elementarer Schwefel. Die für die Alliinase Reaktion typischen Thiosulfinate sind nicht nachweisbar. Keusgen postulierte 2008 den in Abbildung 4.29 dargestellten zweistufigen Reaktionsmechanismus, in dem das Cystin zunächst an den Cofaktor der Alliinase, Pyridoxal-5'-Phosphat gebunden und in Thiocystein umgewandelt wird. Dieses bleibt vermutlich gebunden und wird in einem zweiten Reaktionszyklus in Disulfid umgewandelt. Disulfid wird dann von dem Enzym losgelöst und oxidiert entweder zu elementarem Schwefel oder disproportioniert zu Schwefelwasserstoff und elementarem Schwefel. Durch die Reaktion von Disulfid mit den Allylsulfensäuren entstehen vermutlich Allylpolysulfide [Keusgen 2008].

Kettenverlängerung und Verkürzung kann in Polysulfiden durch Schwefeltransfer zwischen einzelnen Molekülen stattfinden. Dieser verläuft über ein Thiosulfoxid als Zwischenstufe oder über einen vierfach koordinierten Schwefel (Abb. 4.30) [Münchberg et al. 2007].

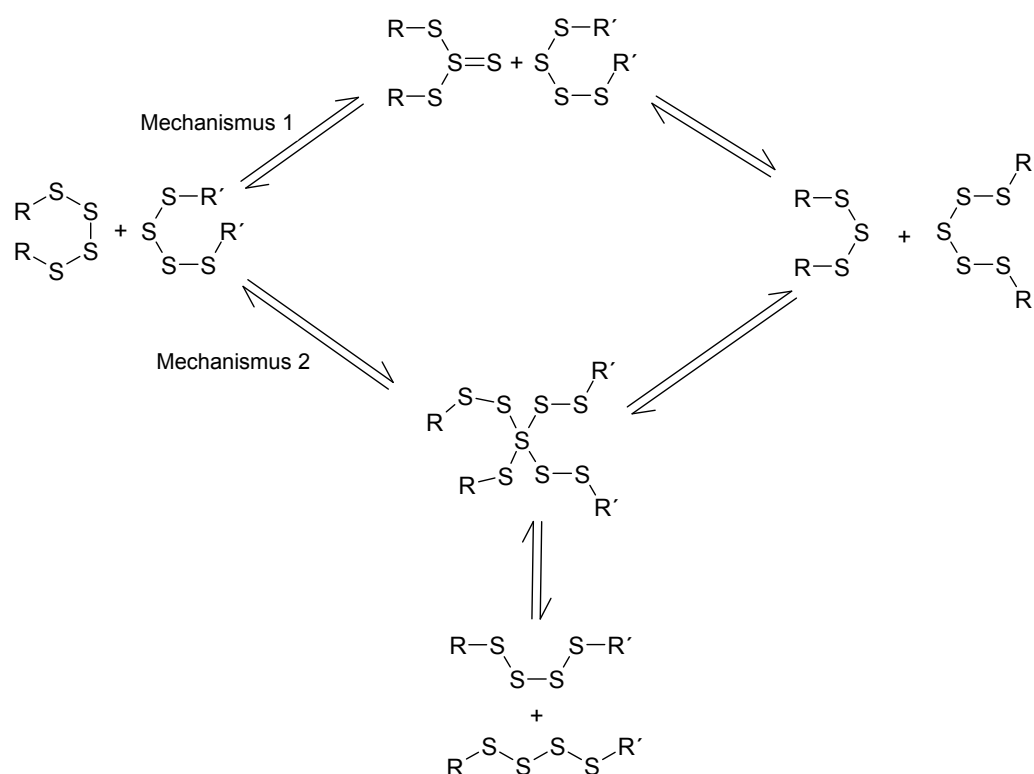


Abb. 4.30 Mögliche Mechanismen zum Schwefeltransfer in Polysulfiden (nach Münchberg et al. 2007)



Ähnliche Reaktionen sind für das neu isolierte Alliinase-ähnliche Enzym ebenfalls denkbar. Demnach würde natürlich vorkommendes Cystein von dem Enzym zu Disulfid umgesetzt. Disulfid reagiert dann mit der ebenfalls entstehenden Pyrrolylsulfensäure zu den Polysulfiden, aus dem sich dann das Tetrathiodipyrrol bildet. Dieses polymerisiert dann im folgenden. Das Dimer schien hierbei stabiler zu sein. Zusätzlich können die Polypyrrole oxidiert werden. Weitere Untersuchungen, besonders die Isolierung der Komponenten zur Verifizierung der Struktur sind nötig. Die Ableitung der Struktur aus den Fragmentierungsmustern ist besonders ohne Vergleichssubstanzen nicht genau und unterliegt verschiedenen Interpretationen. Die Fragmente ließen sich mit den angegebenen Strukturen erklären; als Beweis kann dies aber letztendlich nicht dienen. Weitere Strukturaufklärung aus den noch recht komplexen Mischungen ist nicht möglich. Im folgenden wird also eine Isolierung und Charakterisierung dieser Substanzen nötig sein, um die Schlussfolgerungen zu untermauern.

Eine weitere Polythiopyrrolstruktur war  $m/z$  450 (Abb. 4.31). Sie konnte durch Polymerisation eines Pentathiopyrrols mit einem Pyrrolylmethylthiosulfonat entstehen. Dieses Pyrrolylmethylthiosulfonat selbst war nicht nachweisbar. Vermutlich ist diese Verbindung relativ instabil, so dass sie sofort weiterreagierte oder durch Polymerisation stabilisiert wurde.

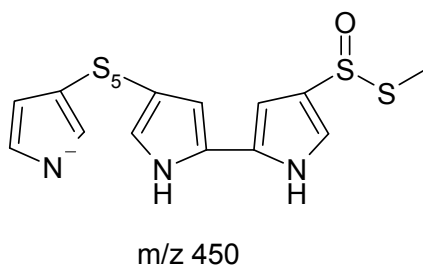


Abb. 4.31: Mögliche Struktur von  $m/z$  450

Analog zu diesem Derivat sind eine Reihe weiterer Verbindungen denkbar, die sich aus dem Thiosulfonat und anderen Farbstoffderivaten bilden.

#### 4.4.3 weitere Kondensationsprodukte

Ein weiteres sehr interessantes Produkt konnte in den Farbstoffextrakten nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um ein Farbstoffmolekül, substituiert mit einer weiteren Thiopyrrolgruppe (Abb. 4.32). Die Struktur konnte mit dem MS/MS Fragmentierungsmuster untermauert werden. Eine vollständige Strukturaufklärung war aus dem Komponentengemisch nicht möglich. Die Position an der das Molekül substituiert ist, ist außerdem unklar.

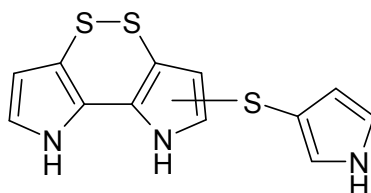


Abb. 4.32: mögliche Struktur des Farbstoffderivates

Für die mögliche Synthese dieses Derivates kommen zwei mögliche Wege in Betracht. Zum einen kann die Biosynthese analog der Biosynthese von Ajoen oder der von Cepaenen erfolgen.

Ajoen wurde 1983 erstmals beschrieben [Apitz-Castro et al. 1983]. Aspitz-Castro et al. isolierten Substanzen aus Knoblauchextrakten, die starke antithrombotische Eigenschaften aufweisen. Der Name Ajoen leitet sich vom spanischen Wort „ajo“ für Knoblauch ab. Die Ausgangssubstanz ist vermutlich Allicin (Abb. 4.33). Neben der Diallylverbindung konnten auch die Methyl- und die Dimethylderivate nachgewiesen werden.

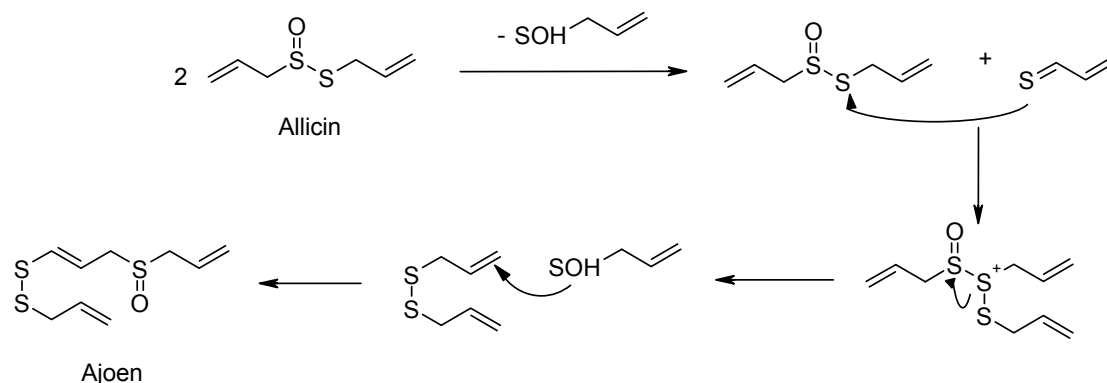


Abb. 4.33: Biosynthese von Ajoen aus Allicin

Die Cepaene sind eine Gruppe von  $\alpha$ -Sulfinyldisulfiden. Deren bisher isolierte Vertreter weisen sehr unterschiedliche biologische Aktivitäten auf, wie die Hemmung der Aggregation der Blutplättchen [Kawakishi und Morimitsu 1988, Morimitsu et al. 1992] oder ein antiasthmatischer Effekt durch die Hemmung der 5-Lipoxygenase und Cyclooxygenase [Wagner et al. 1990, Bayer et al. 1989]. Der erste Schritt der Biogenese ist vermutlich eine carbophile Addition (Abb. 4.34).

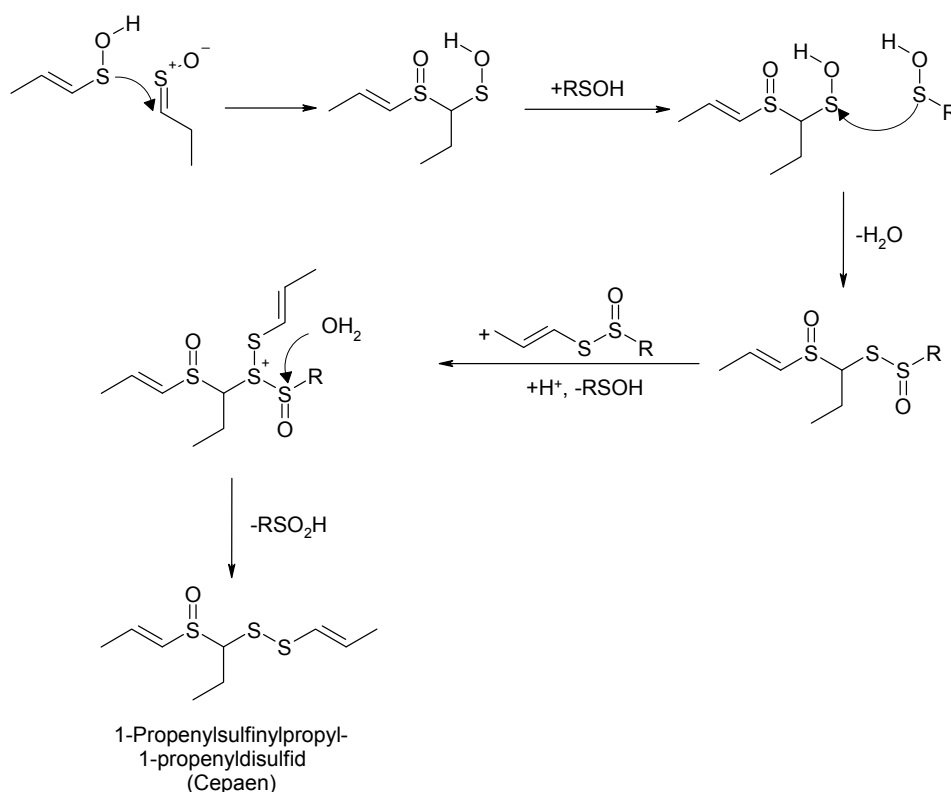


Abb. 4.34: Biosynthese der Cypaene

Ausgehend von diesen beiden für Knoblauch und Zwiebeln bekannten Biosynthesewegen für wichtige sekundäre Pflanzenstoffe lassen sich zwei mögliche Varianten für die Bildung des Derivates ableiten. Die erste Möglichkeit basiert auf der Biosynthese der Ajoene. Der zweite Schritt der Ajoensynthese ist der Angriff einer Sulfensäure an eine Doppelbindung eines Disulfides. Der Farbstoff könnte hierbei als Disulfid dienen, das mit einer Pyrrolylsulfensäure reagiert (Abb. 4.35). Im Gegensatz zur Ajoensynthese würde auf diese Reaktion noch die Reduktion der Sulfoxidgruppe folgen. Das entstehende Produkt wäre ein am C4 substituiertes Farbstoffmolekül.

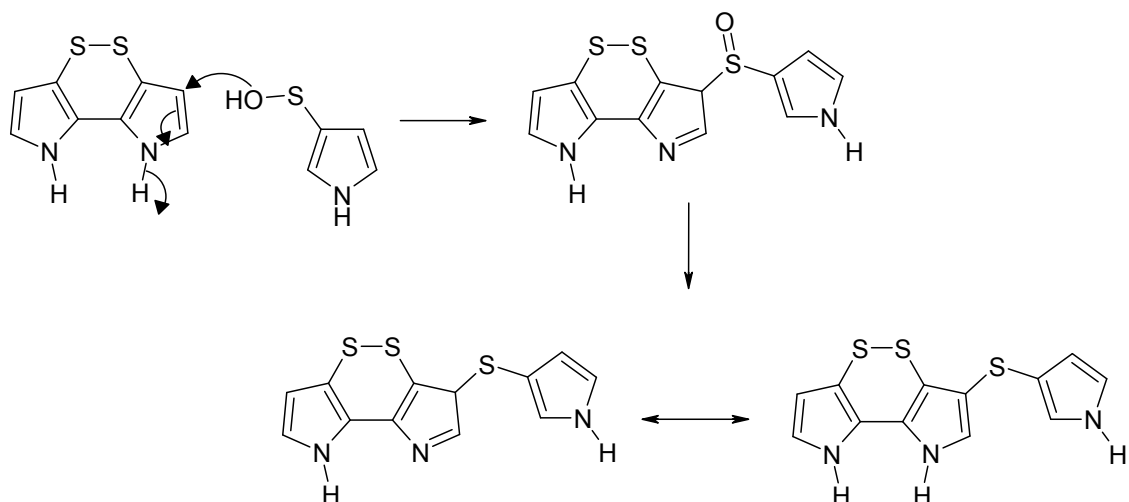


Abb. 4.35: Mögliche Biosynthese des Farbstoff Derivates in Anlehnung an die Ajoen Biosynthese

Die zweite Möglichkeit zur Biosynthese des Derivates verläuft analog zur Biosynthese der Cepaene. Ausgangssubstanz wäre hierbei die Pyrrolylsulfensäure. Die Synthese fände über mehrere Zwischenstufen statt. Der letzte Schritt würde eine Wasserabspaltung darstellen, und zu einem am C3 des Farbstoffes substituierten Derivat führen (Abb. 4.36).

Rückschlüsse über die Biosynthesewege könnten über die Isolierung des Derivates gewonnen werden. Das Substitutionsmuster muss in Zukunft durch NMR-Messungen bestimmt werden. Aus diesem Substitutionsmuster lassen sich Rückschlüsse auf die Biosynthese ziehen.

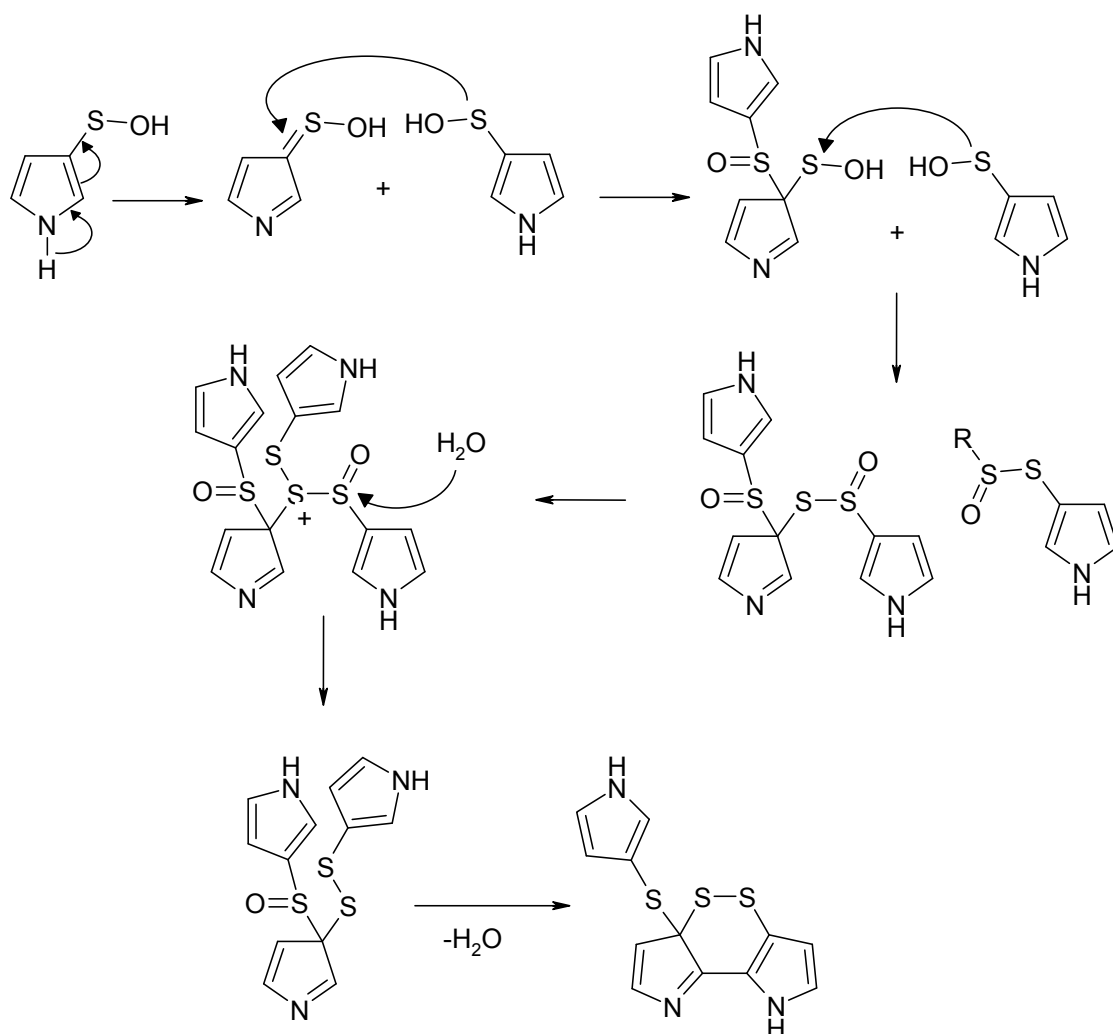


Abb. 4.36: Mögliche Biosynthese des Farbstoff Derivates in Anlehnung an die Cepaen-Biosynthese

#### 4.4.4 Zusammenfassung der Bestimmung weiterer Substanzen in Farbstoffextrakten

Es konnten einige Substanzen neben dem Farbstoff nachgewiesen werden. Diese Substanzen zeigten die Diversität der Reaktionen an den Schwefelverbindungen. Die Reaktionen, aus denen die vorgestellten Verbindungen hervorgingen, können auch zu einer Vielzahl ähnlicher Verbindungen führen.

In Zukunft sind auf diesem Gebiet noch viele Fragen offen. Die vorgestellten Verbindungen müssen aufgereinigt werden, um eine bessere Strukturaufklärung zu ermöglichen und um die putativen Strukturen zu verifizieren. Zusätzlich müssen die Extrakte auf weitere mögliche Reaktionsprodukte untersucht werden.

#### **4.5 Inhaltsstoffe von *A. stipitatum***

Viele Arten des Subgenus *Melanocrommyum* zeichnen sich durch die Bildung des in den vorherigen Kapiteln beschriebenen roten Farbstoffes aus. Andere Arten hingegen zeigen keine Rotfärbung bei einer Verletzung der Zellen. Zu diesen Arten gehören z. B. *A. stipitatum*, *A. aflatunense* oder *A. alexeianum*. *A. stipitatum* nimmt in dieser Reihe eine besondere Stellung ein. Zum einen handelt es sich um eine sehr weit verbreitete Art, die von einigen Völkern intensiv genutzt wird. Zwiebeln dieser Art werden eingelegt oder getrocknet mit Joghurt gegessen (*mu sir*). Die rohen Zwiebeln werden nach bisherigem Kenntnisstand nicht genutzt. Der Grund hierfür ist der sehr scharfe, stechende Geruch und Geschmack der Zwiebeln. Die Vorbehandlung durch Einlegen und der Verzehr mit Joghurt mildert diese Schärfe ab und macht die Pflanzen genießbar. Die Schärfe von *Allium*-Arten wird allgemein mit einem hohen Gehalt an Cysteinsulfoxiden in Verbindung gebracht. Diese werden bei einer Beschädigung der Zellen von dem Enzym Alliinase zu den primären und sekundären Aromastoffen umgesetzt. Interessant ist im Falle des *Allium stipitatum* ein sehr geringer Gehalt an den primär untersuchten Cysteinsulfoxiden Methiin, Alliin, Isoalliin und Propiin. Krest et al. [2000b] konnten in den Zwiebeln einen Gesamtgehalt an Cysteinsulfoxiden von 0,044% nachweisen. Dieser Wert ist im Vergleich mit anderen Arten eher gering, und steht in keinem Verhältnis zu dem intensiven Geruch oder Geschmack. Hieraus kann also geschlossen werden, dass für die Aromaqualitäten dieser Art andere Inhaltsstoffe verantwortlich sind, oder dass andere Cysteinsulfoxide in dieser Art vorliegen. Zusätzlich gehört *A. stipitatum* nicht zu jenen Arten des Subgenus *Melanocrommyum*, die den roten Farbstoff ausbilden. Möglich ist hier eine analoge Reaktion eines anderen Cysteinsulfoxid mit einem Alliinase-ähnlichem Enzym zu Komponenten, die nicht gefärbt sind, dafür aber aroma-aktiv.

#### 4.5.1 Cysteinsulfoxide

Für Arten des Subgenus *Melanocrommyum* wie *A. rosenorum* und *A. macleanii* konnte Pyrrolylcysteinsulfoxid als bisher nicht bekanntes Cysteinsulfoxid nachgewiesen werden. Dies diene als Ausgangssubstanz für die Biosynthese des Farbstoffes, war allerdings in Zwiebeln von *A. stipitatum* nicht nachzuweisen. Stattdessen wurde in den methanolischen Extrakten eine bisher unbekannte Substanz detektiert. Eine Isolierung und vollständige Strukturaufklärung war nicht möglich. Das Fragmentierungsmuster der MS/MS Messungen ließ auf ein Cysteinsulfoxid schließen. Als Substituent kam ein Pyridinylrest in Frage. Die Substanz mit  $m/z$  215 (pos. Ionisierung) hatte demnach ein Molekulargewicht von 214 g/mol. Die Retentionszeit der HPLC-Bestimmung ließ auf ein Molekül schließen, das etwas unpolarer als das isolierte Pyrrolylcysteinsulfoxid ist. Beide Punkte unterstützten die Annahme eines Pyridinylcysteinsulfoxides. Eine Isolierung und vollständige Strukturaufklärung mit NMR- und HR-MS-Messungen sind nötig, um dies zu bestätigen. Auch können aus den bisherigen Ergebnissen keine Rückschlüsse auf die Stereochemie und auf die Verknüpfung des Cysteinsulfoxidrestes mit dem Pyridin gezogen werden.

#### 4.5.2 Reaktionen mit Alliinase-ähnlichen Enzymen

Gibbons et al. konnten aus *A. stipitatum* und *A. holandicum* ein Pyridinyl-N-oxid isolieren, für das antibakterielle Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Die Struktur dieser isolierten Substanz ist in Abbildung 4.37 wiedergegeben. Diese Substanz könnte aus der Reaktion des Pyridinylcysteinsulfoxides mit einem Alliinase-ähnlichen Enzyms entstanden sein. Da die von Gibbons isolierte Substanz die Schwefelsubstitution an Position C2 des Pyridinringes trägt, sollte in diesem Fall das Pyridinylcysteinsulfoxid ebenfalls an C2 substituiert sein.

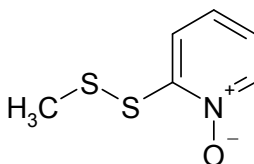


Abb. 4.37: Antibakterielles Pyridinyl-N-oxid isoliert aus *A. stipitatum*

Die möglichen Reaktionen eines Alliinase-ähnlichen Enzyms mit Pyridinylcysteinsulfoxid und Methiin sind in Abbildung 4.38 wiedergegeben. Die Reaktionen sind in Übereinstimmung mit den Reaktionen der Cysteinsulfoxide mit Alliinase. Diese Reaktion führt zu Thiosulfinaten, die vermutlich instabil sind und im folgenden zu weiteren Aromakomponenten reagieren.

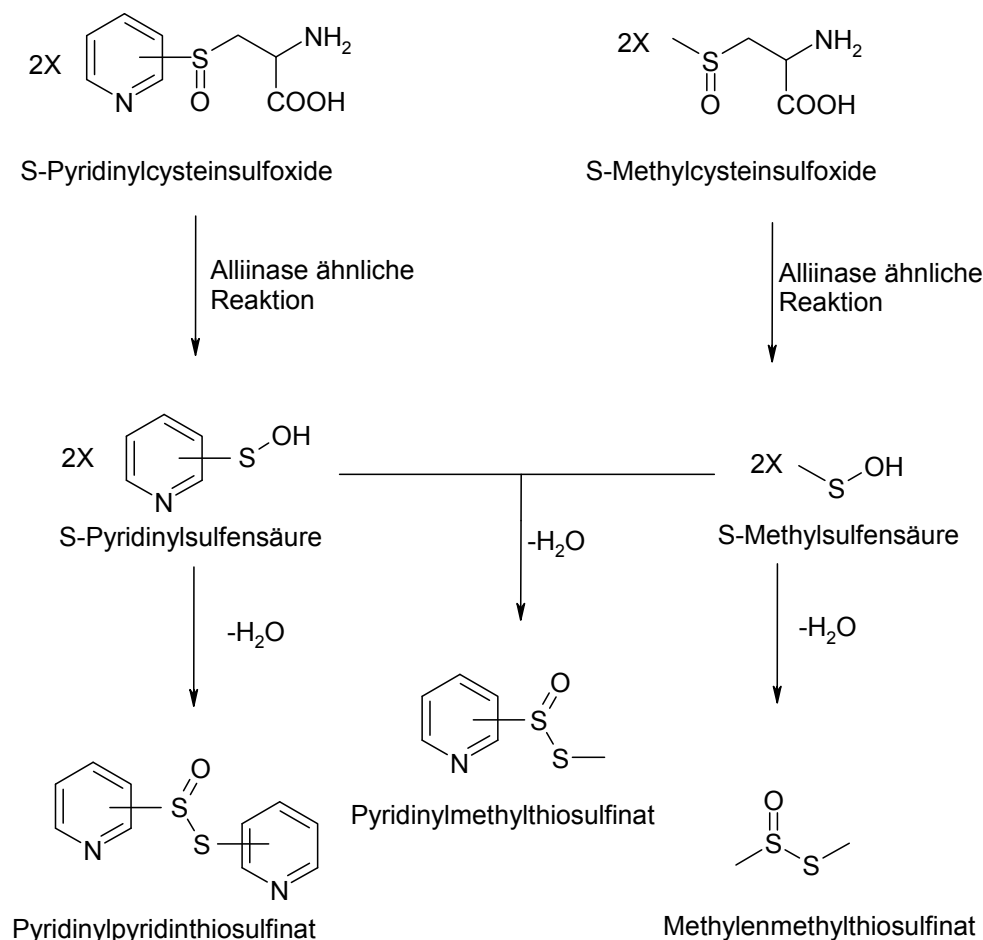


Abb. 4.38: Mögliche Reaktionen von *S*-Pyridinylcysteinsulfoxides und Methiin mit einem Alliinase-ähnlichen Enzym

Die Reaktionsprodukte sollten durch Umsetzung von methanolischen Extrakten aus *A. stipitatum* mit Enzymrohextrakten untersucht werden. Mit den zugesetzten Enzymen aus *A. stipitatum* und *A. maclearii* fand ein Abbau der beiden in dem Extrakt enthaltenen Cysteinsulfoxide, dem Pyridinyl-Derivat und Methiin, statt. Die entstehenden Produkte konnten mittels HPLC mit UV-Detektion und massenspektrometrisch untersucht werden. Den sich aus den  $m/z$ -Werten ergebenden



Molekülmassen wurden Strukturen zugeordnet, deren Überprüfung allerdings nicht möglich war. So konnten für diese Substanzen keine Fragmentierungsmuster ermittelt werden. Eine Isolierung war im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nicht möglich.

Die relativen Änderungen der Konzentrationen durch die Zugabe der Enzymrohextrakte ist in Abbildung 4.39 wiedergegeben.

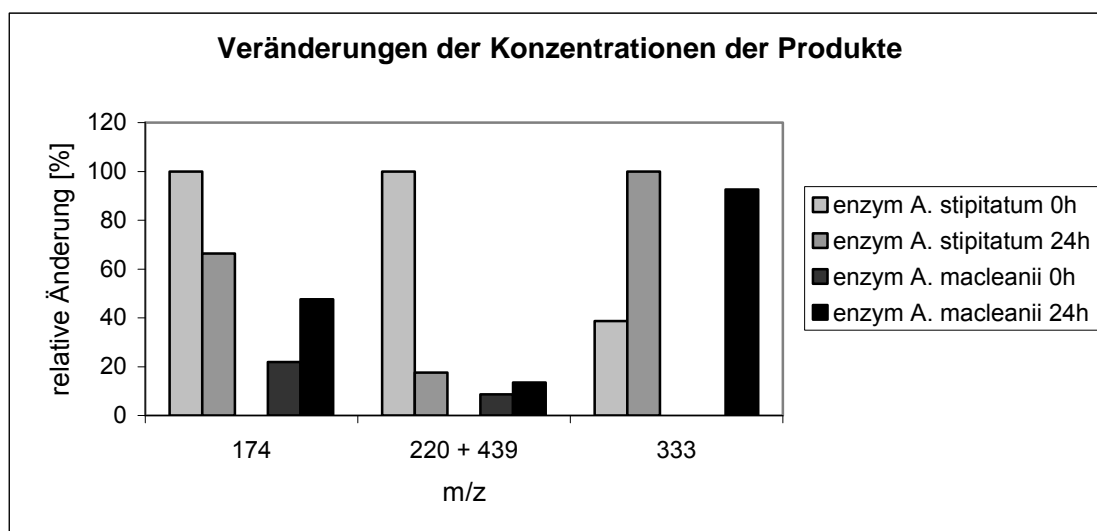


Abb. 4.39: Veränderungen der relativen Konzentration der Reaktionsprodukte nach Zugabe eines Enzymrohextraktes von *A. stipitatum* und *A. macleeanii*

Das Pyridinylcysteinsulfoxid wurde von beiden Enzymen umgesetzt, allerdings in unterschiedlichen Maßen. Enzymextrakte aus *A. stipitatum* setzten die Substanz sehr schnell und vollständig um, Extrakte aus *A. macleeanii* nicht die gesamte Menge. Reste der Sulfoxide konnten in allen Proben nachgewiesen werden. Auch Methiin wurde von beiden Enzymextrakten umgesetzt, jedoch von dem aus *A. macleeanii* etwas besser. Diese Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit der Charakterisierung des neu isolierten Enzyms aus *A. macleeanii* und der bekannten Substratspezifitäten von Alliinasen aus anderen Arten. Die jeweiligen natürlichen Substrate wurden am besten, andere Cysteinsulfoxide aber ebenfalls umgesetzt. Das Enzym aus *A. stipitatum* ist vermutlich ähnlich der Alliinase aus Knoblauch oder dem Alliinase-ähnlichen Enzym aus *A. macleeanii*. Auch hier schien die Umsetzung für das natürlich in der höchsten Konzentration vorkommende Cysteinsulfoxid am stärksten zu sein. Methiin als nur in geringerer Konzentration vorkommendes Cysteinsulfoxid wurde ebenfalls umgesetzt,

allerdings in etwas geringerem Umfang als das Pyridin-Derivat. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte für das isolierte Alliinase-ähnliche Enzym aus *A. macleanii* keine Umsetzung von Methiin nachgewiesen werden. Bei den eingesetzten Lösungen handelte es sich um Rohextrakte, es waren also noch eine Vielzahl anderer Enzyme, vermutlich auch Alliinase enthalten. Diese konnte dann Methiin umsetzen. Die nicht vollständige Umsetzung lässt auf eine geringe Alliinase Aktivität schließen.

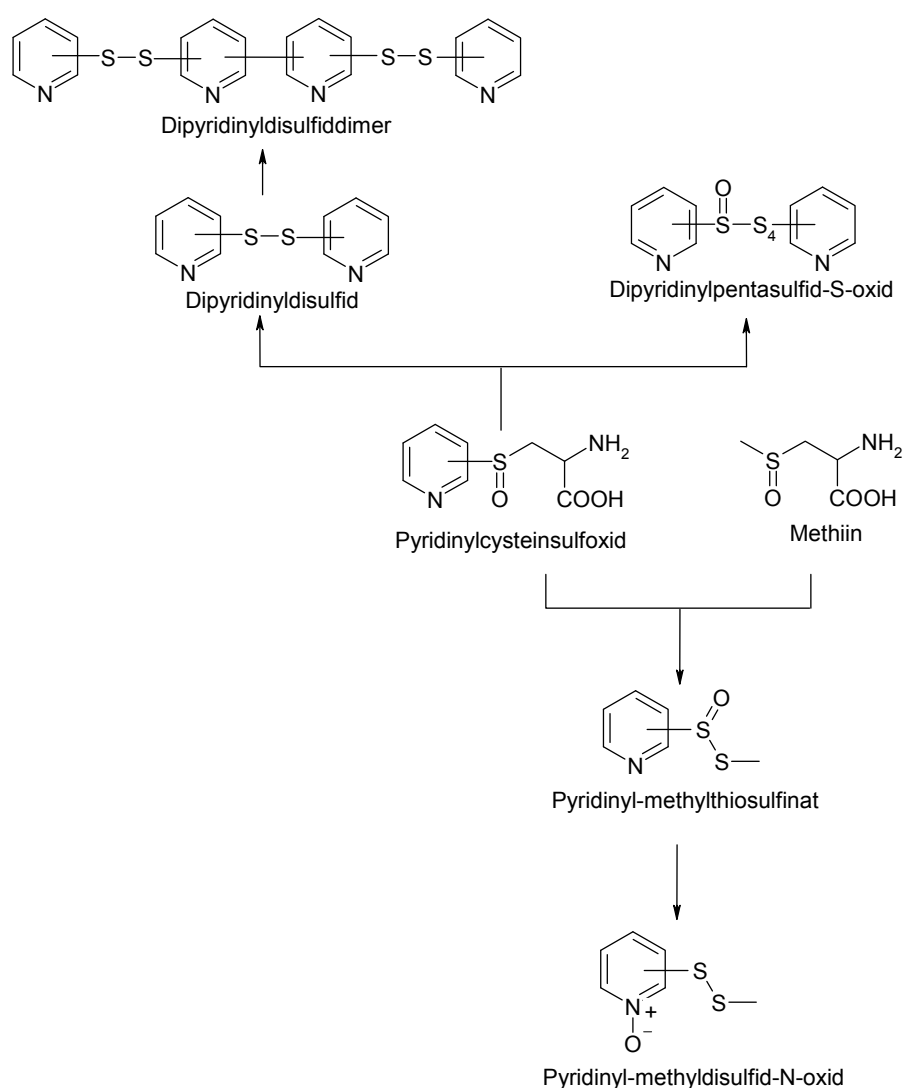


Abb. 4.40: Reaktionen der Cysteinsulfoxide zu den Produkten (Pyridinylmethylsulfoxid, Pentathiopyridinoxid und Pyridinylsulfoxid dimer)

Als Produkte wurden zunächst zwei Substanzen mit  $m/z$  220/439 und  $m/z$  175 gebildet. Diese könnten dem in Abbildung 4.40 wiedergegebenen Tetrathiotetrapyridinderivat

und einem Pyridinylmethylthiosulfonat entsprechen. Nach längerer Inkubation nahm die Konzentration beider Substanzen ab. 24 Stunden nach der Zugabe des Enzyms aus *A. stipitatum* lagen nur noch 66,3% des Pyridinylmethylthiosulfonates und 17,6% des Tetrathiotetrapyridin Derivates vor. Stattdessen konnte ein neues Signal mit  $m/z$  333 detektiert werden (Abb. 4.39). Dies entsprach dem in Abbildung 4.40 wiedergegebenen Pentasulfidmonooxid-Derivat.

Die Bildung des Thiosulfonates ist in Übereinstimmung mit der Reaktion der Cysteinsulfoxide, die durch Alliinase katalysiert wird (vgl. Kapitel 1.3.2). Bei dieser Reaktion entstehen zunächst symmetrische Thiosulfonate, die sich im Anschluss in unsymmetrische Thiosulfonate umlagern können [Block 1992]. In einer folgenden Reaktion könnte dann der Sauerstoff auf den Stickstoff übertragen werden. Das Resultat wäre das von Gibbons beschriebene N-Oxid. Die Reaktion ist unter Annahme der Substitution am C2 in Abbildung 4.39 wiedergegeben. Aus den vorliegenden Daten konnte nicht geschlossen werden, welche der beiden Substanzen in dem Extrakt vorliegt.

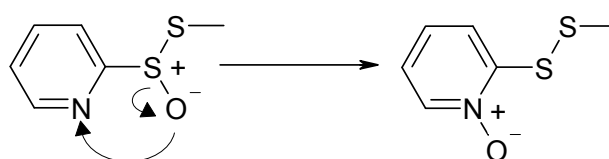


Abb. 4.41: Umlagerung des Methylpyridinylsulfoxides in ein Methylpyridinyl-N-oxid

Die anderen beiden Derivate wurden analog den in Kapitel 4.4 beschriebenen Reaktionen gebildet.

Insgesamt waren die Reaktionen in *A. stipitatum* also denen in Arten, die einen roten Farbstoff bilden, sehr ähnlich. Das für die Bildung des Farbstoffes benötigte Pyrrolyl-Cysteinsulfoxid konnte hier nicht nachgewiesen werden, dafür aber ein Pyridinylcysteinsulfoxid. Dieses wurde sowohl von Rohenzym Lösungen von *A. stipitatum* als auch *A. macleanii* umgesetzt. Die entstehenden Produkte ähnelten strukturell denen aus *A. rosenorum*, *A. jesdianum* und *A. macleanii*. Es konnten nur drei Produkte zugeordnet werden, vermutlich entstanden jedoch noch eine Vielzahl weiterer Verbindungen. Auch in gealterten Extrakten lassen sich möglicherweise weitere Verbindungen nachweisen. Die genaueren Vorgänge und Reaktionen in *A. stipitatum* müssen in Zukunft genauer untersucht werden.

#### **4.6 Steroide in *Allium* Subgenus *Melanocrommyum* Arten**

Auch wenn Saponine aus Pflanzen seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts untersucht werden, erhalten sie erst in der letzten Zeit größere Aufmerksamkeit. Saponine sind an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt und spielen damit eine wichtige Rolle in der Natur. Auch die Saponine und Steroide aus *Allium*-Arten, besonders Zwiebel und Knoblauch, wurden in den letzten Jahren immer intensiver untersucht. In diesen Arten konnten zahlreiche Saponine nachgewiesen werden, denen antifungizide, antitumoröse, zytotoxische, Blut koagulierende, antispasmodische und Cholesterin senkende Effekte zugeordnet werden [Corea et al. 2005, Matsuura 2001, Lanzotti 2006]. Hierzu gehören u.a. Sitosterol, Gitogenin, Cepagenin, Alliofuroside, Tropeoside, Ascalonicoside, Eruboside, Sativoside und Spirostanol Derivate [Review von Lanzotti 2006].

Unter den bisher untersuchten Arten ist auch *A. elburzense*, die zum Subgenus *Melanocrommyum* gehört. Allerdings ist diese Art bisher sehr wenig untersucht worden, da es sich um eine endemische Art handelt, die nur im Elburz Gebirge im Iran gefunden wird. Bei der lokalen Bevölkerung ist diese Art bekannt unter dem Namen *Walak*. Die Blätter und Zwiebeln werden als Nahrungsmittel genutzt. In der iranischen Volksmedizin wird die Pflanze außerdem gegen Rheuma, als Aphrodisiakum, Antidiuretikum und Antihelmentikum genutzt. In *A. elburzense* konnten Furostanol Saponine als Hauptmetabolite und Spirostanol Saponine nachgewiesen werden, sowie Alliogenin, Agapanthagenin und Gitogenin Bidesmoside [Barile et al. 2004].

Die für die untersuchten *Melanocrommyum*-Arten nachgewiesenen Steroidglykoside sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Interessant ist, dass innerhalb der einzelnen Arten große Unterschiede auftraten. Die Proben von *A. macleanii* und *A. jesdianum* unterschieden sich untereinander ebenso wie von anderen Arten. Ein Steroidmuster für die einzelnen Arten konnte aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden. So waren in allen drei *A. macleanii* Arten *A. giganteum* 8, *A. macleanii* 1, *A. karataviense* 1, Agapanthagen, Diosgenin und Cepagenin nachzuweisen, *A. jesdianum* 2, *A. karataviense* 6, Elburzenoid A und Elburzenoid C dagegen nur in einzelnen Proben. In den beiden *A. jesdianum* Proben ergab sich ein ähnliches Bild. *A. giganteum* 1, *A. macleanii* 1 und *A. karataviense* 1 konnten in beiden Proben nachgewiesen werden, *A. karataviense* 9, *A. karataviense* 12, Agapanthagen Glykosid und Cepagenin dagegen nur in jeweils einer Probe.

Außerdem waren in den Proben nicht alle Steroide nachzuweisen, die in der Literatur für diese Arten beschrieben wurden. So konnten in *A. elburzense* keine Elburzenoide nachgewiesen werden. Steroide, die aus bestimmten Arten zuerst isoliert wurden, sind in anderen Arten nachgewiesen worden.

Spezies	enthaltene Steroide
<b><i>A. macleanii</i> 6150</b>	<i>A. jesdianum</i> 2, <i>A. giganteum</i> 8, <i>A. macleanii</i> 1, <i>A. karataviense</i> 1, <i>A. karataviense</i> 6, Agapanthagen, Diosgenin, Cepagenin
<b><i>A. macleanii</i> Usbekistan</b>	<i>A. macleanii</i> 2/ <i>A. karataviense</i> 4, <i>A. giganteum</i> 8, <i>A. macleanii</i> 1, <i>A. karataviense</i> 1, Elburzenoid A, Agapanthagen, Diosgenin, Cepagenin
<b><i>A. macleanii</i> 6240</b>	<i>A. giganteum</i> 2/ <i>A. karataviense</i> 3, <i>A. giganteum</i> 8, <i>A. macleanii</i> 1, <i>A. karataviense</i> 1, Elburzenoid C, Agapanthagen, Diosgenin, Cepagenin
<b><i>A. jesdianum</i> 1180</b>	<i>A. giganteum</i> 1, <i>A. macleanii</i> 1, <i>A. karataviense</i> 1, <i>A. karataviense</i> 9, <i>A. karataviense</i> 12
<b><i>A. jesdianum</i> 1178</b>	<i>A. giganteum</i> 1, <i>A. macleanii</i> 1, <i>A. karataviense</i> 1, Agapanthagen glukosid, Cepagenin
<b><i>A. stipitatum</i> 1076</b>	<i>A. macleanii</i> 2/ <i>A. karataviense</i> 4, <i>A. macleanii</i> 1, <i>A. karataviense</i> 12, Diosgenin
<b><i>A. elburzense</i> 1208</b>	<i>A. giganteum</i> 8, <i>A. macleanii</i> 1, <i>A. karataviense</i> 1, <i>A. karataviense</i> 12, Diosgenin, Cepagenin
<b><i>A. rosenorum</i> 6153</b>	<i>A. giganteum</i> 8, <i>A. macleanii</i> 1

Tab. 4.11: In *Allium* Subgenus *Melanocrommyum* nachgewiesene Steroide

Möglicherweise war die Produktion von Steroiden stärker von den Standortbedingungen der Pflanzen abhängig als von der Art. So könnten sich durch die große räumliche Distanz der Standorte der Pflanzen voneinander und aufgrund der

Abgeschiedenheit der Gebiete Unterarten gebildet haben. Dies führt dann auch zur Biosynthese leicht unterschiedlicher Steroidglykoside und erklärt damit die unterschiedlichen Ergebnisse.

Die vorliegenden Ergebnisse gaben Hinweise auf die Steroidzusammensetzung, konnten diese aber nicht endgültig beweisen. Zur Bestätigung dieser vorläufigen Ergebnisse sind in Zukunft weitere Untersuchungen nötig. Die einzelnen Steroide müssen über einen Vergleich mit Standards oder über eine teilweise Aufreinigung und Strukturbestimmung überprüft werden.

#### 4.7 Untersuchungen der Steroidglykoside in Extrakten von *Hoodia*, *Stapelia* und verwandten Arten

Im Laufe der letzten Jahre sind Phytopharmazeutika immer beliebter geworden. Die allgemeine Tendenz geht hierbei zu „natürlichen“ pflanzlichen Produkten. Die Skepsis der Menschen gegen synthetische Pharmazeutika und die Pharmaindustrie ist nach einigen Skandalen in den letzten Jahren offenbar gestiegen. Ein gutes Beispiel für ein Phytopharmaka, das gegen Adipositas eingesetzt wird, sind die Sukkulente der Gattung *Hoodia*. Im Laufe der letzten Jahre wurden unzählige Produkte aus *Hoodia*-Arten auf den Markt gebracht. Das wirksame Steroidglykosid wurde als P57 (Abb. 4.42) bezeichnet. Die Hunger unterdrückende Wirkung konnte in Fütterungsexperimenten an Ratten nachgewiesen werden.

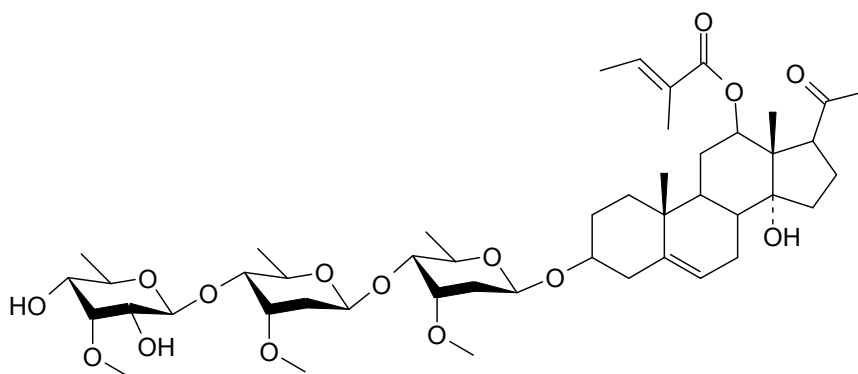


Abb. 4.42: Struktur des wirksamen Steroidglykosides (P57) aus *Hoodia* (MW: 878 g/mol)

Verschiedene Arten der Gattung *Hoodia* und *Stapelia* sowie *Quaqua mamilaris*, *Tromotriche revoluta* und *Orbea decaismena* wurden mittels HPLC-MS Messungen auf ihren Gehalt an Steroidglykosiden untersucht. Zusätzlich wurde eine aus dem

Internet bezogene Kapsel, die ein Pulver aus *Hoodia gordonii* enthalten soll und als Abnehmhilfe angeboten wird, getestet. Die in den einzelnen Arten nachgewiesenen Steroidglykoside sind in Tabelle 4.12 zusammengefasst. Die aktive Substanz P57 konnte nicht nur in *Hoodia gordonii* 2 und 3 sondern auch in *Hoodia ruschii* und *Hoodia juttae*, sowie in *Stapelia grandiflora* und *Stapelia gigantea* nachgewiesen werden. Von diesen *Stapelia* Arten ist bisher keine hungerunterdrückende Wirkung bekannt. Vermutlich ist in diesen Arten der Zuckerrest verändert, so dass sich das Molekulargewicht nicht ändert. Die Wirkung kann dadurch signifikant beeinflusst werden. Auffällig ist, dass für einige Substanzen unterschiedliche Retentionszeiten in einzelnen Arten auftraten (z.B. Hoodigosid E, F, K, N). Dies spricht für unterschiedliche Substanzen mit gleichem Molekulargewicht in diesen Proben. Die Unterschiede können durch unterschiedliche Zuckerreste bedingt sein.

Außerdem war die Schwankung zwischen den einzelnen Arten sehr groß. Ein für *Hoodia gordonii* typisches Steroidmuster konnte in den drei Proben nicht bestimmt werden. In zwei der Proben konnte P57 nachgewiesen werden, in einer Probe allerdings nicht. Möglicherweise lag hier die Konzentration dieser Substanz zu niedrig. Die Steroidzusammensetzung der untersuchten Kapsel lieferte ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis bezüglich der enthaltenen Pflanzenextrakte. P57 konnte auch hier nicht nachgewiesen werden, dafür aber einige andere Steroide, wie Hoodigosid A, C, E, K, L und P.

Interessant ist, dass auch viele der *Stapelia* und verwandten Arten offensichtlich ähnliche Steroidglykoside enthielten wie die *Hoodia*-Arten. Eine genauere Untersuchung der Steroide in diesen Arten ist nötig. Bisher wurde in diesem Zusammenhang nur *Stapelia variegata* untersucht [El Sayed et al. 1995]. Hier konnten einige Pregnanglykoside nachgewiesen werden.

Um genauere Aussagen über die Steroidzusammensetzung der einzelnen Arten zu erhalten, ist ein Abgleich mit Standards oder eine teilweise Aufreinigung dieser Substanzen notwendig. Standards dieser neuen Steroide sind nicht verfügbar, da diese Substanzen erst in den letzten zwei Jahren genauer untersucht wurden.

Substanzname	Formel und MG	Quelle	Pflanzenextrakte
<b>Grundgerüst: 12-O-β-tigloyl-3β,14β-dihydroxy-pregn-5-en-20-on</b>			
<b>Hoodigosid A</b>	C <sub>40</sub> H <sub>62</sub> O <sub>12</sub> MG 734,4	1	<i>Hoodia goordonii</i> 1+2, <i>Hoodia juttae</i> , <i>Hoodia currorii</i> , <i>Stapelia leendertziae</i> , Kapsel
<b>Hoodigosid B</b>	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>16</sub> MG 894,5	1	<i>Hoodia currorii</i> , <i>Stapelia grandiflora</i> , <i>Stapelia gigantea</i> , <i>Stapelia leendertziae</i> , <i>Quaqua mamilaris</i> , <i>Tromotriche revoluta</i>
<b>Hoodigosid C</b> <b>Gordonosid 3; B</b> <b>Formel 7; 12</b>	C <sub>54</sub> H <sub>86</sub> O <sub>18</sub> MG 1022,5	1, 2	<i>Hoodia goordonii</i> 2+3, <i>Hoodia bradei</i> , <i>Hoodia ruschii</i> , <i>Hoodia juttae</i> , <i>Stapelia gigantea</i> , Kapsel
<b>Hoodigoside D</b>	C <sub>54</sub> H <sub>86</sub> O <sub>19</sub> MG 1038,5	1	<i>Hoodia goordonii</i> 2, <i>Hoodia ruschii</i> , <i>Stapelia gigantea</i> , <i>Stapelia leendertziae</i> , <i>Orbea decaismeana</i>
<b>Hoodigosid E</b> <b>Gordonosid 8</b>	C <sub>53</sub> H <sub>84</sub> O <sub>20</sub> MG 1040,5	1, 2	<i>Hoodia goordonii</i> 1+2
			<i>Hoodia ruschii</i> , Kapsel
<b>Hoodigosid F</b>	C <sub>60</sub> H <sub>96</sub> O <sub>23</sub> MG 1284,6	1	<i>Hoodia goordonii</i> 3
			<i>Hoodia bradei</i>
<b>Hoodigosid K</b>	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>18</sub> MG 898,4	1	<i>Hoodia goordonii</i> 2+3, <i>Hoodia flavum</i> , <i>Stapelia grandiflora</i> , <i>Stapelia gigantea</i> , <i>Stapelia leendertziae</i>
			<i>Orbea decaismeana</i> , Kapsel
<b>Hoodigosid 12</b> <b>Formel 6</b> <b>P57AS3</b>	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>15</sub> MG 878,5	1; 5; 6	<i>Hoodia goordonii</i> 2+3, <i>Hoodia ruschii</i> , <i>Hoodia juttae</i> , <i>Stapelia grandiflora</i> , <i>Stapelia gigantea</i>
<b>Gordonosid D</b> <b>Formel 8</b>	C <sub>53</sub> H <sub>84</sub> O <sub>17</sub> MG 992,6	2	<i>Hoodia bradei</i> , <i>Hoodia juttae</i> , <i>Stapelia grandiflora</i> , <i>Stapelia gigantea</i>



<b>Gordonosid E</b>	$C_{54}H_{86}O_{17}$ MG 1006,6	2	<i>Hoodia goordonii</i> 1-3, <i>Hoodia bradei</i> , <i>Hoodia ruschii</i> , <i>Hoodia juttae</i> , <i>Hoodia flavum</i> , <i>Hoodia currorii</i> , Kapsel
<b>Gordonosid L</b> <b>Formel 11</b>	$C_{61}H_{98}O_{20}$ MG 1150, 7	2; 5	<i>Hoodia goordonii</i> 2, <i>Hoodia bradei</i> , <i>Hoodia flavum</i>
<b>Grundgerüst: Calogenin</b>			
<b>Hoodigosid L</b>	$C_{58}H_{94}O_{26}$ MG 1206,6	3	<i>Hoodia goordonii</i> , <i>Hoodia ruschii</i> , Kapsel
<b>Hoodigosid V</b>	$C_{46}H_{74}O_{16}$ MG 882,5	3	<i>Hoodia ruschii</i> , <i>Tromotriche revoluta</i>
<b>Hoodigosid M</b>	$C_{53}H_{88}O_{25}$ MG 1124,5	3	<i>Hoodia goordonii</i> 2+3, <i>Hoodia pilifera</i> , <i>Hoodia bradei</i> , <i>Hoodia ruschii</i> , <i>Hoodia juttae</i>
<b>Hoodigosid N</b>	$C_{35}H_{58}O_{10}$ MG 638,4	3	<i>Hoodia goordonii</i> 1, <i>Hoodia pilifera</i> , <i>Hoodia juttae</i> , <i>Hoodia flavum</i> , <i>Stapelia gigantea</i>
			<i>Hoodia currorii</i> , <i>Quaqua mamilaris</i>
<b>Hoodigosid O</b>	$C_{52}H_{84}O_{21}$ MG 1044,5	3	<i>Hoodia goordonii</i> 1+2, <i>Hoodia bradei</i> , <i>Hoodia ruschii</i> , <i>Hoodia juttae</i> , <i>Hoodia currorii</i> , <i>Stapelia gigantea</i> , <i>Quaqua mamilaris</i> , <i>Orbea decaismeana</i> , Kapsel
<b>Hoodigosid P</b>	$C_{58}H_{94}O_{25}$ MG 1190,6	3	<i>Hoodia goordonii</i> 3, <i>Hoodia juttae</i> , <i>Stapelia gigantea</i>

Tab. 4.12 Verteilung der nachgewiesenen Steroidglykoside in den untersuchten Pflanzenarten  
[Quelle: 1: Pawar 2007a; 2: Dall'Acqua 2007; 3: Pawar 2007b, 4: van Heerden 1999; 5: Abrahamse 2007]

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Von den mehr als 700 *Allium*-Arten weltweit gehören etwa 200 dem Subgenus *Melanocrommyum* an. Diese Untergattung ist vorwiegend in den Bergregionen Zentralasiens beheimatet. Während ihre Vertreter in Europa und in Amerika nur als Ziergewächse, als sogenannte Paukenschlägerlauche, bekannt sind, haben sie in ihren Heimatländern vielfältige Bedeutungen. Neben der Verwendung als Nahrungsmittel (z.B. eingelegte Zwiebeln von *A. stipitatum*, Blätter von *A. rosenorum* in Suppen) werden einigen dieser Arten auch pharmazeutische Wirkungen nachgesagt. So dient z.B. *A. motor* als Tonikum zur Stärkung nach langen Wintern und die Blätter von *A. karataviense* zur besseren Wundheilung. In Europa und Amerika ist dies kaum bekannt und wissenschaftlich wenig untersucht.

Interessanterweise bilden einige Arten dieses Subgenus bei einer Verletzung der Zellstruktur eine rote Verfärbung aus. Diese kann an allen Pflanzenteilen beobachtet werden. Zunächst ist die Farbe hellrot bis orange und dunkelt dann langsam bis hin zu dunkelrot. In länger gelagerten Proben, z.B. in alten Herbarien, wandelt sich die Färbung in Grün.

Die Struktur dieses Farbstoffes konnte vor kurzem von Jedelská für die Spezies *A. giganteum* als Dithiodipyrrol aufgeklärt werden. Damit gehört dieser keiner der bekannten Farbstoffgattungen an, sondern den Schwefelpyrrolfarbstoffen, die bisher noch in keiner anderen Pflanzenart nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund ist eine genauere Untersuchung der Biosynthese dieses Pigments von Bedeutung. Es scheint sich um eine enzymatische Reaktion zu handeln. Farblose, enzyminaktivierte Extrakte verfärben sich durch die Zugabe von Enzymrohextrakten der selben Art sowie von Knoblauch rot. Des weiteren kann eine Verfärbung durch ein Alkalisieren der Extrakte erreicht werden.

Ziel dieser Arbeit war also nähere Erkenntnisse über die Biosynthese des Farbstoffes zu erlangen. Hierzu wurde zunächst der in der intakten Zelle stabile Vorläufer isoliert und charakterisiert. Die aus einem wässrigen Extrakt isolierbare Substanz stellte sich als ein bisher nicht bekanntes Cysteinsulfoxid heraus, L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid. Die Strukturaufklärung erfolgte über HR-MS, MS/MS, NMR und IR Messungen sowie über die Bestimmung der optischen Rotation.

Die Isolierung des an der Reaktion beteiligten Enzyms erfolgte über eine Kombination aus Gel- und Affinitätschromatographie. Die durch Gelchromatographie vorgereinigten Enzymextrakte wurden mittels einer Nickel-Sepharose Säule weiter aufgereinigt. Hierzu wurde eine Nickel HisTrap Säule verwendet. Die Elution des Proteins erfolgte über einen pH-Gradienten. In einem weiteren Schritt wurde eine *Lens culinaris*-Lektin-Säule eingesetzt. Das Protein konnte hier durch einen Gradienten mit steigender  $\alpha$ -Methylmannosekonzentration eluiert werden.

Das Enzym besteht aus mindestens zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 25 und 30 kDa. Die Größe des nativen Proteins beträgt 110 bis 120 kDa. Vermutlich handelt es sich um ein Glykoprotein mit Glukose und/ oder Mannoseresten in der Seitenkette. Das Enzym hat zwei Haupteigenschaften. Zum einen setzt es den isolierten Precursor in einer Alliinase-ähnlichen Reaktion um. Zum anderen zeigt es aber auch eine Polyphenoloxidase-Aktivität. Hierbei werden Polyphenole wie Brenzcatechin oder Dopamin zu braunen Produkten oxidiert. Die natürlichen Substrate dieser Reaktion sind nicht bekannt.

Zur Charakterisierung des Proteins wurde die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt. Diese zeigt Übereinstimmungen mit Speicherproteinen aus verschiedenen Pflanzenfamilien. Dies lässt zwei Rückschlüsse zu. Zum einen könnte der enzymatisch-aktive Teil des Proteins an ein Speicherprotein gebunden sein, das den N-terminalen Rest des Proteins ausmacht. Zum anderen könnte es sich aber auch um einen Vertreter aus der Gruppe der vegetativen Speicherproteine handeln. Diese Gruppe von Proteinen haben neben der Speicherfunktion in vielen Fällen auch eine enzymatische Aktivität. Zur genaueren Überprüfung sind weitere Untersuchungen notwendig. So kann eine Untersuchung der Peptidfragmente nach einem tryptischen Verdau weitere Informationen über die Art des Proteins liefern.

Zusätzlich wurden die kinetischen Parameter wie  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte, Temperatur- und pH-Optimum nicht nur für die Alliinase-ähnliche und die Polyphenoloxidase-Aktivität, sondern auch für die Bildung des Farbstoffes als Summenparameter bestimmt.

Die Alliinase-ähnliche Aktivität ist maximal bei pH 5 und 7,5. Das Temperaturoptimum liegt bei 36°C, zwei kleinere Maxima bei 20°C (71%) und 22,5°C (78%). Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte wurden nach Lineweaver-Burk und Hanes berechnet. Die  $K_m$ -Werte betragen  $2,80 \cdot 10^{-5}$  mol/l, bzw.  $2,42 \cdot 10^{-5}$  mol/l, die  $V_{max}$ -Werte 93,40 nkat/mg, bzw. 84,34 nkat/mg.

Neben dem natürlichen Substrat werden auch andere, synthetisch hergestellte Cysteinsulfoxide umgesetzt. Besonders gut reagiert hierbei das Thiazol-Derivat (73%), aber auch das Pyridin- und das Furanderivat (jeweils 42%), sowie Propiin (36%) und Alliin (30%). Praktisch nicht umgesetzt werden Methiin und Butiin. Die enzymatische Aktivität kann vollständig durch Zusatz von Aminoxyacetat gehemmt werden, was darauf hindeutet, dass es sich bei dem Enzym um ein Pyridoxal-5'-phosphat abhängiges Enzym handelt.

Die kinetischen Parameter der Polyphenoloxidase-Aktivität wurden für Dopamin und Brenzcatechin bestimmt, da keine natürlichen Substrate bekannt sind. Die Bildung der Oxidationsprodukte konnte bei 340 und 405 nm bestimmt werden. Für Brenzcatechin liegt das pH-Optimum bei pH 7,5. Daneben treten weitere Maxima bei niedrigeren pH-Werten auf. Das Temperaturoptimum befindet sich bei 34°C (340 nm) oder 20°C (405 nm). Für Dopamin liegt das pH-Optimum bei pH 8,5, das Temperaturoptimum bei 38°C.

Die  $K_m$ -Werte betragen nach Lineweaver-Burk 0,16 (0,15) mol/l für Brenzcatechin und 0,66 (1,16) mol/l für Dopamin, nach Hanes 0,22 (0,32) mol/l für Brenzcatechin und 1,02 (1,54) mol/l für Dopamin. Die  $V_{max}$ -Werte für Brenzcatechin liegen nach Lineweaver-Burk bei  $1,04 \cdot 10^7$  ( $1,80 \cdot 10^7$ ) nkat/mg und nach Hanes bei  $1,13 \cdot 10^{10}$  ( $2,38 \cdot 10^{10}$ ) nkat/mg. Die  $V_{max}$ -Werte für Dopamin berechnen sich nach Lineweaver-Burk auf  $22,07 \cdot 10^7$  ( $7,31 \cdot 10^7$ ) nkat/mg und nach Hanes  $2,68 \cdot 10^{10}$  ( $9,44 \cdot 10^{10}$ ) nkat/mg.

Die höchste Aktivität zeigt das Enzym mit Dopamin als Substrat. Auch Kaffeesäure (51%) und Brenzcatechin (44%) werden gut umgesetzt, Hydrochinon (37%) und Gallussäure (29%) nur etwas schlechter. Fast keine Aktivität zeigt das Enzym bei Resorcin. Die Ergebnisse sprechen für eine  $\sigma$ -Polyphenoloxidase. Die enzymatische Aktivität kann durch Zusatz von EDTA auf 45% des Ausgangswertes gesenkt werden. Die Zugabe von Zinkionen stellt die Aktivität wieder her. Ein Zusatz von Kupferionen erhöht die Aktivität nur leicht (5%, bzw. 14%).

Als natürliche Substrate kommen Flavonoide wie z.B. Quercetin oder der Farbstoff und seine Derivate in Frage. Von diesen konnten verschiedene Oxidationsprodukte nachgewiesen werden.

Als Summenparameter wurde die Aktivität zur Bildung des Farbstoffes bei 492 nm und 540 nm bestimmt. Hier lag das Maximum bei pH 7,5 (75,5, bzw. 24,1%). Das Temperaturoptimum liegt bei 32°C, zwei kleinere Maxima bei 36°C (97%, bzw. 88,9%) und 40°C (79,1%, bzw. 75%). Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte wurden nach Lineweaver-Burk

und nach Hanes bestimmt. Die  $K_m$ -Werte betragen  $7,61 \cdot 10^{-6}$  ( $1,01 \cdot 10^{-5}$ ) mol/l, bzw.  $7,08 \cdot 10^{-6}$  ( $1,13 \cdot 10^{-5}$ ) mol/l, die  $V_{max}$ -Werte  $1,42 \cdot 10^{-3}$  ( $1,52 \cdot 10^{-3}$ ) nkat/mg, bzw.  $8,84 \cdot 10^{-4}$  ( $9,73 \cdot 10^{-4}$ ) nkat/mg.

Des weiteren konnte im Verlauf dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der von Jedelská isolierte Farbstoff auch in anderen Vertretern des Subgenus *Melanocrommyum* gebildet wird. Er konnte in Extrakten von *A. macleanii*, *A. rosenorum* und *A. jesdianum* detektiert werden. Eine Isolierung war hier allerdings nicht möglich. Zusätzlich konnten einige weitere Reaktionsprodukte nachgewiesen werden. So konnten Polymerisierungsprodukte in Ring- und in Kettenform sowie deren Oxide gefunden werden. Ein weiteres, weit verbreitetes Reaktionsmodell ist offensichtlich die Bildung von Polysulfiden. Einige Produkte dieser Reaktionen konnten in Extrakten detektiert werden. So kommen auch die Polymere von Polysulfiden vor sowie deren Oxidationsprodukte. Des weiteren finden vermutlich Reaktionen analog der Ajoen- oder der Cepaen-Biosynthese statt. Alle diese Verbindungen konnten nicht isoliert werden, eine vollständige Strukturaufklärung war deshalb nicht möglich. Die Vorschläge zur Struktur ergeben sich aus den HPLC-MS und MS/MS Daten.

In der Zukunft sind also noch eine Vielzahl weiterer Untersuchungen nötig, um die Vorgänge in der Pflanze besser zu verstehen. Die Folge- und Nebenprodukte der Farbstoffbildung müssen besser untersucht werden. Auch eine weitere Aufreinigung ist hier sinnvoll, auch wenn dies aufgrund der Vielzahl der Produkte und ihrer Instabilität schwierig ist.

Ein weiteres Thema dieser Arbeit war die Untersuchung einer weiteren pharmazeutisch relevanten Inhaltsstoffgruppe, den Steroidsaponinen. Hier wurden neben einigen Arten der Gattung *Allium* auch einige Vertreter der Gattungen *Hoodia*, *Stapelia* sowie verwandter Arten untersucht. Die Untersuchung erfolgte hauptsächlich mittels HPLC-UV/MS. In beiden Untersuchungen konnten in allen Arten einige Steroidsaponine detektiert werden. Diese konnten verschiedenen bereits nachgewiesenen Strukturen zugeordnet werden. Eine genauere Untersuchung dieser Inhaltstoffe ist allerdings noch notwendig.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abrahamse, S.L., Povey, K.J., Rees, D.D. (2007) Appetite suppressant compositions, *US Patent Application*, US 2007/0207227
- Al-Yahya, M.A.-A., Abdel-Sattar, E., Guittet, E. (2000) Pregnane glycosides from *Caralluma russeliana*, *J. Nat. Prod.*, **63**, 1451-1453
- Anderson, C., Pinsirodom, P., Parkin, K.L. (2002) Hydrolytic selectivity of patatin (lipid acyl hydrolase) from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers towards various lipids, *J. Food Biochem.*, **26**, 63–74
- Andrade, P., Willoughby, R., Pomponi, S.A., Kerr, R.G. (1999) Biosynthetic Studies of the Alkaloid, Stevensine, in a Cell Culture of the Marine Sponge *Teichaxinella morchella*, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 4775-4778
- Andrews, D.E., Beams, B., Summers, M.D., Park, W.D. (1988) Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector, *Biochem. J.*, **252**, 199-206
- Apitz-Castro, R., Cabrera, S., Cruz, M.R., Ledezma, E., Jain, M.K. (1983) Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, Arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure, *Thromb. Res.*, **32**, 155-169
- Apitz-Castro, R., Escalante, J., Vargas, R., Jain, M.K. (1986) Ajoene, the antiplatelet principle of garlic, synergistically potentiates of antiaggregatory Action of Prostacyclin, Forskolin, Indomethacin and Dipyridamole on human platelets, *Thromb. Res.*, **42**, 303-311
- Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I. (1997) Polyphenol oxidase from *Allium* sp, *J. agric. Food chem.*, **45**, 2861-2863

Avula, B., Wang, Y.H., Pawar, R.S., Shukla, Y.J., Schaneberg, B., Khan, I.A. (2006) Determination of the appetite suppressant P57 in *Hoodia gordonii* plant extracts and dietary supplements by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC-MSD-TOF) and LC-UV methods, *J. AOAC Int.*, **89**, 606-611

Avula, B., Wang, Y.H., Pawar, R.S., Shukla, Y.J., Khan, I.A. (2007) Chemical fingerprinting of *Hoodia* species and related genera: chemical analysis of oxy pregnane glycosides using high-performance liquid chromatography with UV detection in *Hoodia gordonii*, *J AOAC Int.*, **90**, 1526-31

Avula, B., Wang, Y.H., Pawar, R.S., Shukla, Y.J., Smillie, T.J., Khan, I.A. (2008a) A rapid method for chemical fingerprint analysis of *Hoodia* species, related genera, and dietary supplements using UPLC-UV-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 722-731

Avula, B., Wang, Y.H., Pawar, R.S., Shukla, Y.J., Smillie, T.J., Khan, I.A. (2008b) Identification and structural characterization of steroidal glycosides in *Hoodia gordonii* by ion-trap tandem mass spectrometry and liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 2587-2596

Aydemir, T. (2004) Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, *Food Chem.*, **87**, 59-67

Bai, B., Chen, F., Wang, Z., Liao, X., Zhao, G., Hu, X. (2005) Mechanism of the greening color formation of "Laba" garlic, a traditional homemade Chinese food product, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7103-7107

Barile, E., Zolfaghari, B., Sajjadi, S.E., Lanzotti, V. (2004) Saponins of *Allium elburzense*, *J. Nat. Prod.*, **67**, 2037-2042

Barile, E., Capasso, R., Izzo, A.A., Lanzotti, V., Sajjadi, S.E., Zolfaghari, B. (2005) Structure-activity relationships for saponins from *Allium hirtifolium* and *Allium elburzense* and their antispasmodic activity, *Planta Med.*, **71**, 1010-1018

- Bayer, T., Breu, W., Seligmann, O., Wray, V., Wagner, H. (1989) Biological active Thiosulfinates and  $\alpha$ -Sulfinyldisulfides from *Allium Cepa*, *Phytochemistry*, **28**, 2313-2371
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2008) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, *Springer-Verlag*, Berlin, Heidelberg, Sechste, vollständig überarbeitete Auflage
- Block, E. (1992) Die Organoschwefelchemie der Gattung *Allium* und ihre Bedeutung für die organische Chemie des Schwefels, *Angewandte Chemie*, **104**, 1158-1203
- Blum, H., Breier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, **8**, 93-99
- Boss, P.K., Gardener, R.C., Janssen, B.J., Ross, G.S. (1995) An apple polyphenole oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissue, *Plant Mol. Biol.*, **27**, 429–433
- Bowles, D.J., Marcus, S. (1981) Characterisation of receptors for the endogenous lectins of soybean and jackbean seeds, *FEBS Lett.*, **129**, 135-138
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, **72**, 248-254
- Breu, W. (1996) *Allium cepa* L. (Onion). Part 1: Chemistry and Analysis, *Phytomedicine*, **3**, 293-306
- Brodnitz, M.H., Pascale, J.V., van Derslice, L. (1971) Thiopropanal S-oxide: a lachrymatory factor in onions, *J. Agric. Food. Chem.*, **19**, 269-272
- Bruyns, P. (1993) A revision of *Hoodia* and *Lavrania* (Asclepiadaceae – Stapelieae), *Bot. Jahrb. Syst.*, **115**, 145–270
- Butler, A. (1998) Acquisition and Utilization of Transition Metal Ions by Marine Organisms, *Science*, **281**, 207-210



Campbell, I.D., Bork, P. (1993) Epidermal growth factor-like modules, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**, 385-392

Carr, S. (2006) *Hoodia* in Namibia: cultivation and supply of raw materials, *5th Oxford Int Conf Science of Botanicals: Quality, Safety and Processing of Botanical Products*, August 21–24, 2006, Oxford, MS

Carson, J.F. (1987) Chemistry and biological properties of onion and garlic, *Food Review international*, **3**, 71-103

Carté, B., Faulkner, D.J. (1983) Defensive metabolites from three nembrothid nudibranchs, *J. Org. Chem.*, **48**, 2314-2318

Cavalito, C.J., Bailey, J.H. (1944) Allicin, the Active Principle of *Allium sativum* L.: Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1950-1951

Corea, G., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Capasso, R., Izzo, A.A. (2005) Antispasmodic Saponins from Bulbs of Red Onion *Allium cepa* L. *Tropea*, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 935-940

Cotton, F.A., Wilkinson, G., Murillo, C.A., Bochmann, M. (1999) Advanced Inorganic Chemistry, *Wiley*, Chichester, 6th Edition

Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E., Hendrickson, W.A. (1998) Crystal Structure of a Functional Unit from Octopus Hemocyanin, *J. Mol. Biol.*, **278**, 855-870

Cunningham, B.A., Wang, J.L., Waxdal, M.J., Edelmann, G.M. (1975) The covalent and threedimensional structure of Concanavalin A (II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1503-1512

- Cunningham, S.M., Volenec, J.J. (1996) Purification and characterization of vegetative storage proteins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) taproots, *Plant Physiol.*, **147**, 625–632
- Dall'Acqua, S., Innocenti, B. (2007) Steroidal glycosides from *Hoodia gordonii*, *Steroids*, **72**, 559-568
- Daniel, C., Triboï, E. (2002) Changes in wheat protein aggregation during grain development: effects of temperatures and water stress, *Europ. J. Agronomy*, **16**, 1-12
- Darbyshire, B., Henry, R.J. (1981) Differences in fructan content and synthesis in some *Allium* species, *New Phytol.*, **87**, 249-256
- Davis, J.M., Coleman, G.D., Chen, T.H., Gordon, M.P. (1993) Win4, a family of wound-induced genes in poplar trees, *Plant Physiol.*, **102**, 25
- De Puy, C.H., King, R.W. (1960) Pyrolytic cis eliminations, *Chem. Rev.*, **60**, 431-457
- Deepak, D., Srivastava, S., Khare, A. (1996) Pregnane glycosides from *Hemidesmus indicus*, *Phytochemistry*, **44**, 145-151
- DeWald, D.B., Masou, H.S., Mullet, J.E. (1992) The soybean vegetative storage proteins VSP $\alpha$  and VSP $\beta$  are acid phosphatases active on polyphosphates, *J. Biol. Chem.*, **267**, 15958-15964
- Dhont, C., Castonguay, Y., Avice, J.-C., Chalifour, F.-P. (2006) VSP accumulation and cold-inducible gene expression during autumn hardening and overwintering of alfalfa, *J. Exp. Bot.*, **57**, 2325–2337
- Diaz-Ruiz, C., Montaner, B., Pérez-Tomás, R. (2001) Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1, *Histol. Histopathol.*, **16**, 415-421

- Dogan, S., Dogan, M. (2004) Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*), *Food Chem.*, **88**, 69-77
- Dorsch, W. (1996) *Allium cepa* L. (onion) Part 2 Chemistry, Analysis and Pharmacology, *Phytomedicine*, **3**, 391-397
- Eady, C.C., Kamoi, T., Kato, M., Porter, N.G., Davis, S., Shaw, M., Kamoi, A., Imai, S. (2008) Silencing onion lachrymatory factor synthase causes a significant change in the sulfur secondary metabolite profile, *Plant Physiol*, **147**, 2096-2106
- Edwards, S.J., Britton, G., Collin, H.A. (1994) The biosynthetic pathway of the S-alk(en)yl-L-Cysteine sulfoxides (flavour precursors) in species of *Allium*, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **38**, 181-188
- Eissa, H.E., Fadel, H.H.M., Ibrahim, G.E., Hassan, I.M, Elrashid, A.A. (2006) Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products, *Food Res. Intern.*, **39**, 855-863
- Ellis, R.J. (1993) The general concept of molecular chaperones, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **339**, 257–261
- El Sayed, K.A., Halim, A.F., Zaghloul, A.M., McChesney, J.D., Stone, M.P., Voehler, M., Hayashi, K. (1995) Pregnane glycosides from *Stapelia variegata*, *Phytochemistry*, **39**, 395-403
- Erat, M. ,Sakiroglu, H., Kufrevioglu, O.I. (2006) Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp., *Food Chem.*, **95**, 503-508
- Ernst, M.K., Chatterton, N.J., Harrison P.A., Matitscha, G. (1998) Characterization of Fructane Oligomers from Species Genus *Allium* L., *J. Plant Physiol.*, **153**, 53-60
- Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 147-159

- Friesen, N., Fritsch, R.M., Blattner, F.R. (2006) Phylogeny and New Intrageneric Classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on Nuclear Ribosomal DNA ITS Sequences, *Aliso*, **22**, 372-395
- Fritsch, R.M. (1990) Bericht über Sammelreisen in Tadschikistan (1983-1988) zum Studium von mittelasiatischen Vertretern der Gattung *Allium* L., *Kulturpflanze*, **38**, 363-385
- Fritsch, R., Friesen, N. (2002) Chapter 1. Evolution, Domestication, and Taxonomy, in: H. D. Rabinowitch and L. Currah (eds.) *Allium Crop Science – Recent Advances*, *CABI Publishing*, Wallingford UK, 5-30
- Fritsch, R.M., Keusgen, M. (2006) Occurrence and Taxonomic Significance of Cysteine Sulphoxides in the Genus *Allium* L. (*Alliaceae*)., *Phytochemistry*, **67**, 1127-1135
- Fürstner, A. (2003) Chemistry and Biology of Roseophilin and the Prodigiosin Alkaloids: A Survey of the Last 2500 Years, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 3582-3603
- Gansera, R., Schurz, H., Rüdiger, H. (1979) Lectin-associated proteins from the seeds of *Leguminosae*, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **360**, 1579-1585
- Gebhardt, R. (1993) Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol biosynthesis in hepatocytes, *Lipids*, **28**, 613-619
- Gebhardt, R., Beck, H. (1996) Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures, *Lipids*, **31**, 1269-1276
- Goldstein, I.J., Hollerman, C.E., Smith, E.E. (1965) Protein-carbohydrate interaction II: Inhibition studies of the interaction of Concanavalin A with polysaccharides, *Biochemistry*, **4**, 876-883

- Gomez, L., Faurobert, M. (2002) Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch), *J. Exp. Bot.*, **53**, 2431-2439
- Gooding, M.J., Ellis, R.H., Shewry, P.R., Schofield, J.D. (2003) Effects of Restricted Water Availability and Increased Temperature on the Grain Filling, Drying and Quality of Winter Wheat, *J. Cereal Sci.*, **37**, 295-309
- Graybosch, R.A., Peterson, C.J., Shelton, D.R., Baenziger, P.S. (1996) Genotypic and environmental modification of wheat flour protein composition in relation to end-use quality, *Crop Sci.*, **36**, 296–300
- Gregory, D.S., Martin, A.C.R., Cheetham, J.C., Rees, A.R. (1993) The prediction and characterization of metal binding sites in proteins, *Protein Eng.*, **6**, 29-35
- Gregory, M., Fritsch, R.M., Friesen, N.W., Khassanov, F.O., McNeal, D.W. (1998) Nomenclator Alliorum. *Allium* names and synonyms – a world guide, *Royal Botanic Gardens, Kew*, 83
- Guyonnet, D., Siess, M.H., Le Bon, A.M., Suschetet, M. (1999) Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from *allium* vegetables in rat tissues, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 50-58
- Hadji, I., Marzouki, M.N., Ferraro, D., Fasano, E., Majdoub, H., Pani, G., Limam, F. (2007) Purification and characterization of a Cu,Zn-SOD from garlic (*Allium sativum* L.). Antioxidant effect on tumoral cell lines, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **143**, 129-241
- Hall, D.I., Smith, I.K. (1983) Partial purification and characterisation of cysteine lyase from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), *Plant Physiol.*, **72**, 654-658
- Hamamoto, A., Mazelis, M. (1986) The C-S Lyases of Higher Plants: Isolation and Properties of Homogeneous Cystine Lyase from Broccoli (*Brassica oleracea* var *botrytis*) Buds, *Plant Physiol.*, **80**, 702-706

Hanelt, P (1994) Die taxonomische Gliederung der Gattung *Allium* und ihre Kultur- und Nutzpflanzen, *Drogenreport*, **7**, 17-25

Hanelt, P. (2001) *Allium*. In: Hanelt, P. (Ed.), Mansfeld's Encyclopaedia of Agricultural and Horticultural Crops. First English edition, Wien etc., *Springer-Verlag*, 2250-2269

Heldt, H.-W. (2004) Plant Biochemistry, *Academic Press*, third edition

Hirschberg, H.J.H.B., Simons, J.-W.F.A., Dekker, N., Egmond, M.A. (2001) Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5037–5044

Ho, M.F., Mazelis, M. (1993) The CS-lyases of higher plants, determination of immunology by immunological procedures, *Phytochemistry*, **34**, 625-629

Horak, R.M., Maharaj, V., Hakkinen, J., (2004) A composition comprising a pregnenone derivative and an NSAID, *Brit. UK Patent Application GB 2396815*, 24

Horie, T., Awazu, S., Itakura, Y., Fuwa, T. (1992) Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation, *Planta Med.*, **58**, 468-469

Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., Scrimgeour, K.G. (2002) The principles of Biochemistry, *Prentice Hall*, Upper Saddle River NJ 07458, third edition

Hou, W.-C., Lin, Y.-H. (1997) Dehydroascorbate reductase and mono dehydroascorbate reductase activities of trypsin inhibitors, the major sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) root storage protein, *Plant Sci.*, **128**, 151-158

Huebner, F.R., Nelsen, T.C., Chung, O.K., Bietz, J.A. (1997) Protein distributions among hard red winter wheat varieties as related to environment and baking quality, *Cereal Chem.*, **74**, 123–128

Imai, S., Tsuge, N., Tomotake, M., Magatome, Y., Sawada, H., Nagata, T., Kumagai, H. (2002) An Onion Enzyme that Makes the Eyes Water, *Nature*, **419**, 685

Imai, S., Akita, K., Tomotake, M., Sawada, H. (2006a) Identification of two novel pigment precursors and a Reddish-Purple Pigment Involved in the Blue-Green Discoloration of Onion and Garlic, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 843–847

Imai, S., Akita, K., Tomotake, M., Sawada, H. (2006b) Model Studies on Precursor System Generating Blue Pigment in Onion and Garlic, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 848–852

Inoue, T., Mimaki, Y., Sashida, Y., Nishino, A., Satomi, Y., Nishino, H. (1995) Steroidal Glycosides from *Allium macleanii* and *A. senescens*, and their inhibitory activity on tumour promoter-induced Phospholipid metabolism of HeLa cells, *Phytochemistry*, **40**, 521-525

Iwami, K., Yasumoto, K. (1980) Alliinase-like enzymes in fruiting bodies of *Lentinus edodes*, their purification and substrate specificity, *Agric. Biol. Chem.*, **4**, 3003-3004

Jack, A., Weinzierl, J., Kalb, A. (1971) An X-ray crystallographic study of demetallized concanavalin A, *J. Mol. Biol.*, **58**, 389-395

Jacobsen, J.V., Yamauchi, M., Mann, L.K., Howard, F.D., Bernhard, R.A. (1968) An alkyl-cysteine sulfoxide lyase in *Tulbaghia violacea* and its relation to other alliinase-like enzymes, *Phytochemistry*, **7**, 1099-1108

Jamieson, P.D., Semenov, M.A. (2000) Modelling nitrogen uptake and redistribution in wheat, *Field Crops Res.*, **68**, 21-29

Jansen, H., Müller, B., Knobloch, K. (1989a) Characterisation of an alliin lyase preparation from garlic (*Allium sativum*), *Planta Med.*, **55**, 434-439

Jansen, H., Müller, B., Knobloch, K. (1989b) Alliin lyase from garlic, *Allium sativum*: Investigations on enzyme/substrate, enzyme/inhibitor interactions, and on a new coenzyme, *Planta Med.*, **55**, 440-445

Jedelská, J. (2007) Pharmaceutical Value of Onions (*Allium* L.) and related species of Central Asia, *Promotionsarbeit, Universität Marburg*

John, R.A., Charteris, A., Fowler, L.J. (1978) The reaction of amino-oxyacetate with pyridoxal phosphate-dependent enzymes, *Biochem. J.*, **171**, 771-779

Jones, M.G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A.B., Collin, H.A. (2004) Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic, *J. Exp. Bot.*, **55** (Sulphur Metabolism in Plants Special Issue), 1903-1918

Joslyn, M.A., Peterson, R.G. (1958) Food discoloration: Reddening of White Onion Bulb Purees, *Agric. Food Chem.*, **6**, 754-765

Jursic, B. S. (1997) Theoretical studies of thermal syn elimination reactions of organic amine oxide, sulfoxide and phosphoxide by ab initio and density functional methods, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **389**, 257-263

Justes, E., Thiébau, P., Avice, J.C., Ourry, A., Lemaire, G., Volenec, J.J. (2002) Influence of summer sowing dates, N fertilization and irrigation on autumn VSP accumulation and dynamics of spring regrowth in alfalfa (*Medicago sativa* L.), *J. Exp. Bot.*, **53**, 111-121

Kamauchi, S., Wadahama, H., Iwasaki, K., Nakamoto, Y., Nishizawa, K., Ishimoto, M., Kawada, T., Urade, R. (2008) Molecular cloning and characterization of two soybean protein disulfide isomerases as molecular chaperones for seed storage proteins, *FEBS J.*, **275**, 2644-2658



- Kamitani, H., Esaki, N., Tanaka, H., Imahara, H., Soda, K. (1990) Purification and characterisation of S-Alkyl cysteine a,b-lyase from *Pseudomonas putida*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **36**, 339-347
- Kanellopoulos, P.N., Tucker, P.A., Pavlou, K., Agianian, B., Hamodrakas, S.J. (1996) A triclinic crystal form of the lectin concanavalin A, *J. Struct. Biol.*, **117**, 16-23
- Kawakishi, S., Morimitsu, Y. (1988) New Inhibitor of Platelet aggregation in onion oil, *Lancet*, **332**, 330
- Kawashima, K., Mimaki, Y., Sashida, Y. (1991) Steroidal Saponins from *Allium giganteum* and *A. aflatunense*, *Phytochemistry*, **30**, 3063-3067
- Kazaryan, R. A., Goryachenkova, E. V. (1978) Alliinase: purification and physiochemical properties, *Biokhimiya* (Moskau), **43**, 1905-1913
- Kazlauskas, R., Marwood, J.F., Murphy, P.T., Wells, R.J. (1982) A blue pigment from a compound ascidian, *Aust. J. Chem.*, **35**, 215 –217
- Keilin, D., Mann, T. (1940) Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme, *Biochem. J.*, **34**, 1163-1176
- Keusgen, M. (1997) TLC analysis of *Allium sativum* constituents, *Planta Med.*, **63**, 93-94
- Keusgen, M. (1998) Diastereoselective synthesis of Alliin by an asymmetric sulfur oxidation, *Pharmazie*, **53**, 668-671
- Keusgen, M. (1999) Biosensorische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Cysteinsulfoxiden, *Habilitationsschrift, Universität Bonn*

Keusgen, M., Schulz, H., Glodek, J., Krest, I., Krüger, H., Herchert, N., Keller, J. (2002a) Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity, *J. Agric. Food. Chem.*, **50**, 2884-2890

Keusgen, M. (2002b) Chapter 15: Health and *Alliums*, in: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.) *Allium* Crop Science-Recent Advantages, *CABI Publishing*, Wallingford UK, 357- 378

Keusgen, M., Fritsch, R.M., Hisoriev, H., Kurbonova, P.A., Khassanov, F.O. (2006) Wild *Allium* species (*Alliaceae*) used in folk medicine of Tajikistan and Uzbekistan, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **2**, 18-27

Keusgen, M. (2008) Unusual Cystine Lyase Activity of the enzyme Alliinase: Direct Formation of Polysulphides, *Planta Med*, **74**, 73-79

Kim, M.-J., Kim, C.Y., Park, I. (2005) Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract, *Food Chem*, **89**, 181-184

Knobloch, K., Lohmüller, E., Landshuter, J., Winkler, G. (1991) C-S-Lyasen aus *Allium*- Arten und ihre biochemischen Aktivitäten, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **133**, Suppl. 24, 5-6

Koch, H.P., Lawson L.D. (1996) Garlic: The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species, *Williams & Wilkins*, Baltimore, Maryland, second edition

Koch, H.P., Hahn, G. (1988) Knoblauch, *Urban & Schwarzenberg*, München, Wien, Baltimore

Koch, I., Keusgen, M. (1998) Diastereoselective synthesis of Alliin by an asymmetric sulfur oxidation, *Pharmazie*, **53**, 668-671

- Kochkareva, T.F., Chukavina, A.P. (1985) Wildgrowing foodstuff plants of Khovalingsky region (Central Tadjikistan), *Rastitel'nye Resursy*, **21**, 140-149
- Kopsell, D.A., Randle, W.M. (1999) Selenium affects the S-alk(en)yl Cysteine Sulfoxides among Short-day onion cultivars, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **124**, 307-311
- Körner, B., Berk, Z. (1967) The mechanism of pink-red pigment formation in leeks, *Adv. Front. Plant Sci.*, **18**, 39-52
- Krest, I. (2000a) Entwicklung und Optimierung eines Alliin-Biosensors, *Promotionsarbeit, Universität Bonn*.
- Krest, I., Glodek, J., Keusgen, M. (2000b) Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species, *J. Agric. Food. Chem.*, **48**, 3753-3760
- Kubec, R., Svobodová, M., Velísek, J. (2000) Distribution of S-Alk(en)ylcysteine Sulfoxides in Some *Allium* Species Identification of a New Flavour Precursor: S-Ethylcysteine Sulphoxide (Ethiin), *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 428-433
- Kubec, R., Hrbacova, M., Musah, R., Velisek, J. (2004) *Allium* discoloration: Precursors involved in onion pinking and garlic greening, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5089-5094
- Kubec, R., Velisek, J. (2007) *Allium* Discoloration: The Color-Forming Potential of Individual Thiosulfinates and Amino Acids: Structural Requirements for the Color-Developing Precursors, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 3491–3497
- Kuroda, M., Mimaki, Y., Kameyama, A., Sashida, Y., Nikaido, T. (1995) Steroidal saponins from *Allium chinense* and their inhibitory activities on cyclic AMP phosphodiesterase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, *Phytochemistry*, **40**, 1071-1076
- Küttner, E.B., Hilgenfeld, R., Weiss, M.S. (2002a) Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic, *Arch. Biochem. Biophys.*, **402**, 192-200

- Küttner, E.B., Hilgenfeld, R., Weiss, M.S. (2002b) The active principle of garlic at atomic resolution, *J. Biol. Chem.*, **277**, 46402-46407
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4, *Nature*, **227**, 680-685
- Lancaster, J.E., Reynolds, P.H.S., Shaw, M.L., Dommissie, E.M., Munro, J. (1989a) Intracellular localization of the biosynthetic pathway to flavour precursors in onion, *Phytochemistry*, **28**, 461-464
- Lancaster, J.E., Shaw, M.L. (1989b)  $\gamma$ -glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (flavour precursors) in *Allium*, *Phytochemistry*, **28**, 455-460
- Lancaster, J.E., Shaw, M.L. (1991) Metabolism of  $\gamma$ -glutamyl peptides during development, storage and sprouting in onion bulbs, *Phytochemistry*, **30**, 2857-2859
- Lancaster, J.E., Shaw, M.L., Joyce, M.D., McCallum, J.A., McManus, M.T. (2000) A novel alliinase from onion roots, Biochemical characterization and cDNA cloning, *Plant Physiol.*, **122**, 1269-1279
- Landshuter, J., Lohmüller, E.-M., Knobloch, K. (1994) Purification and characterization of a C-S-lyase from ramson, the wild garlic, *Allium sativum*, *Planta Med.*, **60**, 343-347
- Langheinrich, U., Tischner, R. (1991) Environmental and Stress Physiology: Vegetative Storage Proteins in Poplar 1; Induction and Characterization of a 32- and a 36-Kilodalton Polypeptide, *Plant Physiol.*, **97**, 1017-1025
- Langheinrich, U. (1993) Clonal variation in apical growth and content in vegetative storage proteins in Populus, *Trees*, **7**, 242-249
- Lanzotti, V. (2006) The analysis of onion and garlic, *Journal of Chromatography A*, **1112**, 3-22

- Lawson, L.D., Wang, Z.J., Hughes, B.G. (1991)  $\gamma$ -Glutamyl-S-Alkylcysteines in Garlic and Other *Allium* species: Precursors of Age-Dependent Trans-1-Propenyl Thiosulfinates, *J. Nat. Prod.*, **54**, 436-444
- Lee, C.-H., Parkin, K.L. (1998) Relationship between thiosulfinates and pink discoloration in onion extract, as influenced by pH, *Food chem.*, **61**, 345-350
- Lee, R.A., Balick, M.J. (2007) Indigenous use of *Hoodia gordonii* and appetite suppression, *explore*, **3**, 404-406
- Lehninger, A.L. (1987) Prinzipien der Biochemie, *de Gruyter* Berlin, New York, 1. Auflage
- Leustek, T., Saitom K. (1999) Sulfate transport and assimilation in plants, *Plant Physiol.*, **120**, 637-644
- Leustek, T., Martin, M.N., Bick, J.A., Davies, J.P. (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through Molecular and Genetic Studies, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 141-165
- Lexikon der Biochemie: online Lexikon der Biochemie, Wissenschaft-online, *Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH*
- Lexikon der Biologie: online Lexikon der Biologie, Wissenschaft-online, *Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH*
- Li, L., Hu, D., Jiang, Y., Chen, F., Hu, X., Zhao, G. (2008) A Relationship between  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Activity and Garlic Greening, As Controlled by Temperature, *J Agric. Food Chem.*, **56**, 941–945
- Lindquist, N., Fenical, W., Párkányi, L., Clardy, J. (1991) Polyclinal, a new sulfated polyhydroxy benzaldehyde from the marine ascidian *Polyclinum planum*, *Experientia*, **47**, 504-506

- Liu, Y., Ahn, J.-E., Datta, S., Salzman, R.A., Moon, J., Huyghues-Despointes, B., Pittendrigh, B., Murdock, L.L., Koiwa, H., Zhu-Salzman, K. (2005) Arabidopsis Vegetative Storage Protein Is an Anti-Insect Acid Phosphatase, *Plant Physiol.*, **139**, 1545–1556
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-279
- Lukes, T.M. (1959) Pinking of onions during dehydration, *Food Technol.*, **13**, 391–393
- Lukes, T.M. (1986) Factors governing the greening of garlic puree, *J. Food Sci.*, **51**, 1577-1582
- MacLean D.B., Luo L.-G. (2004) Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside, *Brain Res.*, **1020**, 1-11
- Maricich, T.J., Harrington, C.K. (1972) Meisenheimer rearrangement of methoxymethyl phenyl sulfoxide. The formation and disproportionation of methoxymethyl benzenesulfenate, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5115-5116
- Marloth, R. (1932) In: The Flora of South Africa with Synopsis of the South African Genera of Phanerogamous Plant, Vol. III, *Weldons and Wesley*, London
- Martinez, M.V., Whitaker, J.R. (1995) The biochemistry and control of enzymatic browning, *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 195–200
- Martre, P., Porter, J.R., Jamieson, P.D., Triboï, E. (2003) Modeling Grain Nitrogen Accumulation and Protein Composition to Understand the Sink/Source Regulations of Nitrogen Remobilization for Wheat, *Plant Physiol.*, **133**, 1959–1967
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., Inlow J.K. (2006) Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species, *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 108–123

- Matsuura, H. (2001) Saponins in Garlic as Modifiers of the Risk of Cardiovascular Disease, *J. Nutr.*, **131**, 1000-1005
- Mayer, A.M., Harel, E. (1978) Polyphenols in Plants, *Phytochemistry*, **18**, 193-215
- Mayer, A.M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review, *Phytochemistry*, **67**, 2318–2331
- McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S. (1992) Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, **32**, 253-273
- Mimaki, Y., Kuroda, M., Fukasawa, T., Sashida, Y. (1994a) Steroidal Saponins from the bulbs of *Allium karataviense*, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 738-743
- Mimaki, Y., Nikaido, T., Matsumoto, K., Sashida, Y., Ohmoto, T. (1994b) Steroidal Saponins from the bulbs of *Allium giganteum* exhibiting potent inhibition of cAMP Phosphodiesterase Activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 710-714
- Mimaki, Y., Kuroda, M., Fukasawa, T., Sashida, Y. (1999) Steroidal Glycosides from the Bulbs of *Allium jesdianum*, *J. Nat. Prod.*, **62**, 194
- Montaner, B., Navarro, S., Piqué, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E., Gil, J., Pérez-Tomás, R. (2000) Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines, *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 585-593
- Montaner, B., Pérez-Tomás, R. (2001) Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells, *Life Sci.*, **68**, 2025-2026
- Morimitsu, Y., Morioka, Y., Kawakishi, S. (1992) Inhibitors of Platelet Aggregation Generated from Mixtures of *Allium* Species and/or S-Alk(en)nyl-L-cysteine Sulfoxides, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 360-372
- Münchberg, U., Anwar, A., Mecklenburg, S., Jacob, C. (2007) Polysulfides as biologically active ingredients of garlic, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 1505-1518

- Müntz, K. (1998) Deposition of storage proteins, *Plant Mol. Biol.*, **38**, 77-99
- Mütsch-Eckner, M., Meier, B., Wright, A.D., Sticher, O. (1992)  $\gamma$ -Glutamyl peptides from *Allium sativum* bulbs, *Phytochemistry*, **31**, 2389-2391
- Nock, L.P., Mazelis, M. (1986) The C-S lyases of higher plants: preparation and properties of homogeneous alliin lyase from garlic (*Allium sativum*), *Arch. Biochem. Biophys.*, **249**, 27-33
- Oaks, D.M., Hartmann, H., Dimick, K.P. (1964) Analysis of Sulfur Compounds with Electron Capture Flame Dual Channel Chromatographie, *Anal. Chem.*, **36**, 1560-1565
- Oshumi, C., Hayashi, T. (1993) The oligosaccharide units of the xyloglucans in the cell walls of bulbs of onion, garlic and their hybrid, *Plant Cell Physiol.*, **35**, 963-962
- Pappe, L. (1862) A description of South African forest trees and arborescent shrubs used for technical and economical purposes, *Ward and Co*, W. Britain, second edition
- Park, G., Tomlinson, J.T., Melvin, M.S., Wright, M.W., Day, C.S., Manderville, R.A. (2003) Zinc and copper complexes of prodigiosin: Implications for copper-mediated double-strand DNA cleavage, *Org. Lett.*, **5**, 113-116
- Patil, B.S., Pike, L.M. (1995a) Distribution of quercetin content in different rings of various coloured onion (*Allium cepa* L.) cultivars, *J. Hortic. Sci.*, **70**, 643-650
- Patil, B.S., Pike, L.M., Yoo, K.S. (1995b) Variation in the quercetin content in different colored onions (*Allium cepa* L.), *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **120**, 909-913
- Pawar, R.S., Shukla, Y.J., Khan, I.A. (2007a) New calogenin glycosides from *Hoodia gordonii*, *Steroids*, **72**, 881-891
- Pawar, R.S., Shukla, Y.J., Khan, S.I., Avula, B., Khan, I.A. (2007b) New oxypregnane glycosides from appetite suppressant herbal supplement *Hoodia gordonii*, *Steroids*, **72**, 524-534



- Peters, S. (1997) Die Xanthon-Synthase aus Zellkulturen von *Cenaurium erythraea* RAFN. Nachweis der Cytochrom P450-Enzyms und Reinigung der NADPH Cytochrom P450-Reduktase, *Promotionsarbeit, Universität Bonn*
- Peumans, W.J., Smeets, K., Van Nerum, K., Van Leuven, F., Van Damme, E.J. (1997) Lectin and alliinase are the predominant proteins in nectar from leek (*Allium porrum* L.) flowers, *Planta.*, **201**, 298-302
- Porter, J.R., Semenov, M.A. (2005) Crop responses to climatic variation, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **360**, 2021–2035
- Rabinkov, A., Zhu, X., Graf, G., Galil, G., Mirelman, D. (1994) Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*). Biochemical characterization and cDNA cloning, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **48**, 149-171
- Rabinkov, A., Wilchek, M., Mirelman, D. (1995) Alliinase (alliin lyase) from garlic (*Allium sativum*) is glycosylated at ASN146 and forms a complex with a garlic mannose-specific lectin, *Glycoconj J.*, **12**, 690-698
- Racusen, D., Foote, M. (1980) A major soluble glycoprotein of potato tubers, *J. Food Biochem.*, **4**, 43–52
- Ramirez, E.C., Whitaker, J.R. (1998) Cystine lyases in plants: a comprehensive review, *J. Food Biochem.*, **22**, 427-440
- Randle, W.M, Lancaster, J.E. (2000) Chapter 14: Sulphur compounds in *Alliums*, in: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.) *Allium Crop Science-Recent Advantages*, *CABI Publishing*, Wallingford UK, 332-339
- Rawls, R. (1995) Europe's strong herbal brew, *C&CN*, Washington, **23**, 53-60
- Reihling, H.C. (2008) Bioprospecting the African Renaissance: The new value of muthi in South Africa, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **4**, 9

Reuter, H.D. (1995) *Allium sativum* und *Allium ursinum*: Part 2; Pharmacology and Medical Application, *Phytomedicine*, **2**, 73-91

Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., Cano M.P. (2008) Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties, *Food Chem.*, **108**, 907-916

Römpf-Lexikon online, *Thieme Verlag*, Version 3.1 oder 3.2

Rosahl, S., Schell, J., Willmitzer, L. (1987) Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants: demonstration of an esterase activity, *EMBO Journal*, **6**, 1155–1159

Rose, P., Whiteman, M., Moore, P.K., Zhu, Y.Z. (2005) Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents, *Nat. Prod. Rep.*, **22**, 351-368

Rubin, I.D., Cawthorne, M.A., Bindra, J.S. (2001) Extracts, compounds & pharmaceutical compositions having anti-diabetic activity and their use, *European Patent* EP1 166 792 A2

Salvato, B., Santamaria, M., Beltramini, M., Alzuet, G., Casella L. (1998) The Enzymatic Properties of *Octopus Vulgaris* Hemocyanin:  $\sigma$ -Diphenol Oxidase Activity, *Biochemistry*, **37**, 14065-14077

Sauter, J.J., Van Cleve, B., Appel, K. (1988) Protein bodies in ray cells of *populus x canadensis* Moench 'robusta', *Planta*, **173**, 31–34

Schneider, G., Käck, H., Lindqvist, Y. (2000) The manifold of vitamin B6 dependent enzymes, *Structure*, **8**, R1-6

Schwimmer, S. (1968) Enzymic conversion of trans-(+)-S-1-propenyl-L-cysteine sulfoxide to the bitter odor bearing component of onion, *Phytochemistry*, **7**, 401-404

- Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K. (1996) A cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> from potato tissues appears to be patatin, *Plant Cell Physiol.*, **37**, 347–353
- Sendl, A. (1995) *Allium sativum* and *Allium ursinum*: part 1. Chemistry, analysis, history, botany, *Phytomedicine*, **1**, 323-339
- Senear, D.F., Teller, D.C. (1981) Thermodynamics of concanavalin A dimer-tetramer self association: Sedimentation equilibrium studies, *Biochemistry*, **20**, 3076-3083
- Shannon, S., Yamaguchi, M., Howard, F.D. (1967a) Precursors Involved in the Formation of Pink Pigments in Onion Purees, *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 423-426
- Shannon, S., Yamaguchi, M., Howard, F.D. (1967b) Reactions Involved in Formation of a Pink Pigment in Onion Purees, *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 417-422
- Shen, C., Parkin, K. L. (2000) In Vitro Biogenesis of Pure Thiosulfinates and Propanethial-S-oxide, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6254-6260
- Shen, C., Hong, Z., Parkin, K.L. (2002) Fate and Kinetic Modeling of Reactivity of Alkanesulfenic Acids and Thiosulfinates in Model Systems and Onion Homogenates, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2652-2659
- Shewry, P.R. (2003) Tuber Storage Proteins, *Ann. Bot.*, **91**, 755-769
- Shimon, L.J., Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Frolov, F. (2002) Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*): crystallization and preliminary X-ray characterization, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 1335-1337
- Shimon, L.J., Rabinkov, A., Shin, I., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Frolov, F. (2007) Two structures of alliinase from *Allium sativum* L.: apo form and ternary complex with aminoacrylate reaction intermediate covalently bound to the PLP cofactor, *J. Mol. Biol.*, **366**, 611-625

- Siciliano, T., Bader, A., De Tommasi, N., Morelli, I., Braca, A. (2005) Sulfated pregnane glycosides from *Periploca graeca*, *J. Nat. Prod.*, **68**, 1164-1168
- Siess, M.H., Le Bon, A.M., Canivenc-Lavier, M.C., Suschetet, M. (1997) Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides, *Cancer Lett.*, **120**, 195-201
- Sigler, P., Saksena, R., Deepak, D., Khare, A. (2000) C21 steroidal glycosides from *Hemidesmus indicus*, *Phytochemistry*, **54**, 983-987
- Smeets, K., Van Damme, E.J., Van Leuven F., Peumans, W.J. (1997a) Isolation, characterization and molecular cloning of a leaf-specific lectin from ramsons (*Allium ursinum* L.), *Plant Mol. Biol.*, **35**, 531-535
- Smeets, K., Van Damme, E.J., Verhaert, P., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (1997b) Isolation, characterization and molecular cloning of the mannose-binding lectins from leaves and roots of garlic (*Allium sativum* L.), *Plant Mol. Biol.*, **33**, 223-234
- Smeets, K., Van Damme, E.J.M., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (1997c) Isolation and characterization of lectins and lectin-alliinase complexes from bulbs of garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*), *Glycoconj J.*, **14**, 331-343
- Sparg, S.G., Light, M.E., van Staden, J. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins, *J. Ethnopharmacol.*, **94**, 219-243
- Srivastav, S., Deepak, D., Khare, A. (1994) Three novel pregnane glycosides from *Leptadenia reticulata* Wight and Arn., *Tetrahedron*, **50**, 789-798

Staswick, P.E. (1988) Soybean vegetative storage protein structure and gene expression, *Plant Physiol.*, **87**, 25-54

Stearn, W.T. (1992) How many species of *Allium* are known?, *Kew magazine*, **9**, 180-182

Stepien, V., Martin, F. (1992) Purification, characterization and localization of the bark storage proteins of poplar, *Plant Physiol. Biochem.*, **30**, 399–407

Stepien, V., Sauter, J.J., Martin, F. (1994) Vegetativ storage proteins in woody plants, *Plant Physiol. Biochem.*, **32**, 185–192

Stoll, A., Seebeck, E. (1948) Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. 1. Mitteilung über *Allium*-Substanzen, *Helv. Chim. Acta*, **31**, 189-210

Stoll, A., Seebeck, E. (1949) Über die Spezifität der Alliinase und die Synthese mehrerer dem Alliin verwandter Verbindungen, *Helv. Chim. Acta*, **32**, 866-876

Stoll, A., Seebeck, E. (1951) chemical investigations on Alliin, the active principle of garlic, *Adv. Enzymol.*, **11**, 377-400

Suzuki, M., Cutcliffe, J.A. (1989) Fructans in Onion Bulb in Relation to Storage Life, *Can. J. Plant Sci.*, **69**, 1327-1333

Tian, W.-M., Peng, S.-Q., Wang, X.-C. , Shi, M.-J., Chen, Y.-Y., Hu, Z.-H. (2007) Vegetative Storage Protein in *Litchi chinensis*, a Subtropical Evergreen Fruit Tree, Possesses Trypsin Inhibitor Activity, *Ann. Bot.*, **100**, 1199–1208

Toney, M.D. (2005) Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 279-287

Tonón, C., Daleo, G., Oliva, C. (2001) An acidic  $\beta$ -1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin, *Plant Physiol. Biochem.*, **39**, 849–854

- Tranbarger, T.J., Franceschi, V.R., Hildebrand, D.F., Grimes, H.D. (1991) The soybean 94- kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles, *Plant Cell*, **3**, 973-987
- Triboï, E., Abad, A., Michelena, A., Lloveras, J., Ollier, J.L., Daniel, C. (2000) Environmental effects on the quality of two wheat genotypes: I. Quantitative and qualitative variation of storage proteins, *Eur. J. Agron.*, **13**, 47–64
- Trivedi, R., Khare, A., Khare, M.P. (1989) A pregnane ester oligoglycoside from *Oxystelma esculentum*, *Phytochemistry*, **28**, 1211–1213
- Tulp, O.L., Harbi, N.A., Mihalov, J., DerMadorosian, A. (2001) Effect of *Hoodia* plant on weight loss in congenic obese LA/Ntvl//cp rats, *FASEB J.*, **15**, A404
- Ukai, K., Sekiya, J. (1999) Rapid purification and characterisation of cystin lyase b from broccoli inflorescence, *Phytochemistry*, **51**, 853-859
- van Cleve, B., Apel, K. (1993) Induction by nitrogen and low temperature of storageprotein synthesis in poplar trees exposed to long days, *Planta*, **189**, 157-160
- van Heerden, F.R., Vleggaar, R., Horak, R.M., Learmonth, R.A., Maharaj, V., Whittal, R.D. (1999) Pharmaceutical compositions having appetite-suppressant activity, *Patent application* PCT/GB98/01100
- van Heerden, F.R., Horak, R.M., Maharaj, V.J., Vleggaar, R., Senabe, J.V., Gunning, P.J. (2007) An appetite suppressant from *Hoodia* species, *Phytochemistry*, **68**, 2545-2553
- van Wyk, B.-E. (2008a) A broad review of commercially important southern African medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **119**, 342-355
- van Wyk, B.-E. (2008b) A review of Khoi-San and Cape Dutch medical ethnobotany, *J. Ethnopharmacol.*, **19**, 331-341

- Virtanen, A.I., Spare, C.-G. (1961) Isolation of the precursor of the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*), *Suomen Kemistilehti*, **34**, 72-74
- Virtanen, A.I. (1965) Studies on organic sulphur compounds and other labile substances in plants, *Phytochemistry*, **4**, 207-228
- Wadahama, H., Kamauchi, S., Ishimoto, M., Kawada, T., Urade, R. (2007) Protein disulfide isomerase family proteins involved in soybean protein biogenesis, *FEBS J.*, **274**, 687–703
- Wadahama, H., Kamauchi, S., Nakamoto, Y., Nishizawa, K., Ishimoto, M., Kawada, T., Urade, R. (2008) A novel plant protein disulfide isomerase family homologous to animal P5 – molecular cloning and characterization as a functional protein for folding of soybean seed-storage proteins, *FEBS J.*, **275**, 399–410
- Wagner, H., Dorsch, W., Bayer, Th., Breu, W., Willer, F. (1990) Antiasthmatic Effects of Onions: Inhibition of 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase in vitro by Thiosulfinates and “Cepaenes”, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **39**, 59-62
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Howard-Jones, A.R. (2006) Biological formation of pyrroles: Nature's logic and enzymatic machinery, *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 517-531
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, *Planta*, **218**, 1–14
- Wang, D., Nanding, H., Han, N., Chen, F., Zhao, G. (2008) 2-(1H-Pyrrolyl)carboxylic Acids as Pigment Precursors in Garlic Greening, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1495–1500
- Whitaker, R.J. (1976) Development of flavour, odor and pungency in onion and garlic, *Adv. Food Res.*, **22**, 73-133

White, A., Sloane, B.L. (1937) In: The *Stapelieae*, Vol. III., *Abbey San Encino Press*, Pasadena

Williams, R.J.P. (1987) The Biochemistry of Zinc, *Polyhedron*, **6**, 61-69

Williamson, N.R., Fineran, P.C., Leeper, F.J., Salmond, G.P.C. (2006) The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 887-899

Winkler, G., Iberl, B., Knobloch, K. (1991) Neue Ergebnisse über Allicin-Folgeprodukte in lipophilen Medien, *Deutsche Apotheker Zeitung*, **131**, Suppl. 24, 6-8

Wynberg, R. (2004) Rhetoric, Realism and Benefit-Sharing: Use of Traditional Knowledge of *Hoodia* Species in the Development of an Appetite Suppressant, *J World Intellect Prop*, **7**, 851-876

Yamamoto, C., Takemoto, H., Kuno, H., Yamamoto, D., Tsubura, A., Kamata, K., Hirata, H., Yamamoto, A., Kano, H., Seki, T., Inoue, K. (1999) Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice, *Hepatology*, **30**, 894-902

Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Uemura, Y., Yamamoto, C., Takemoto, H., Hirata, H., Tanaka, K., Hioki, K., Tsubura, A. (2000) Cycloprodigiosin hydrochloride, a H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **126**, 191-197

Yeh, K.-W., Chen, J.C., Lin, M.I., Chen, Y.-M., Lin, C.Y. (1997) Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity, *Plant Mol. Biol.*, **33**, 565-570

Yoruk, R., Marshall, M.R. (2003) Physicochemical properties and fuction of plant polyphenol oxidase: a review, *J. Food Biochem.*, **27**, 361-422



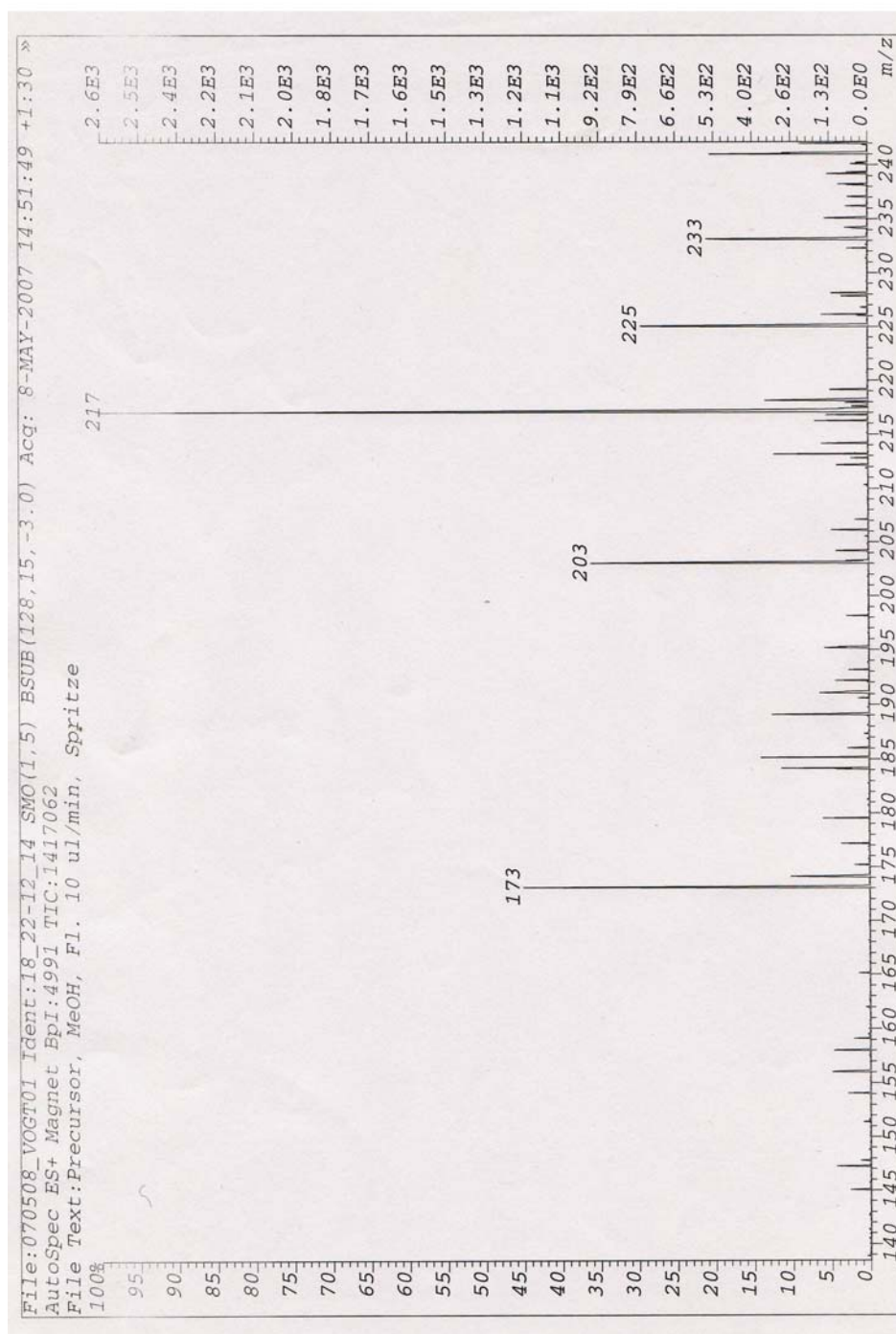
Zhu, J., Khan, K. (2001) Effects of genotype and environment on glutenin polymers and breadmaking quality, *Cereal Chem.*, **78**, 125–130

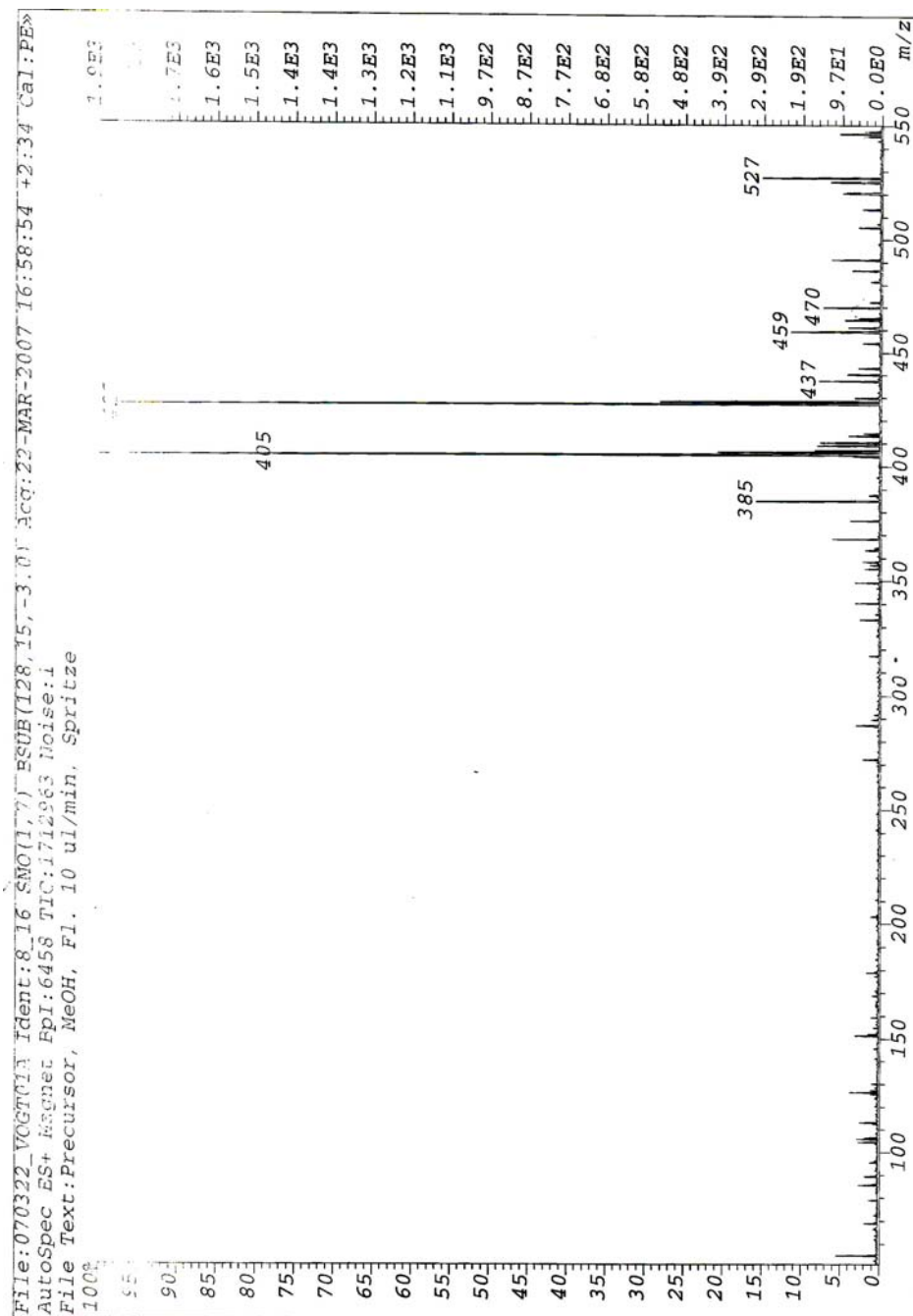
Ziegler, S.J., Sticher, O. (1989) HPLC of S-Alk(en)yl-L-cysteine Derivatives in Garlic Including Quantitative Determination of (+)-S-Allyl-L-cysteine Sulfoxide (Alliin), *Planta Med.*, **55**, 372-378

## 7. Anhang

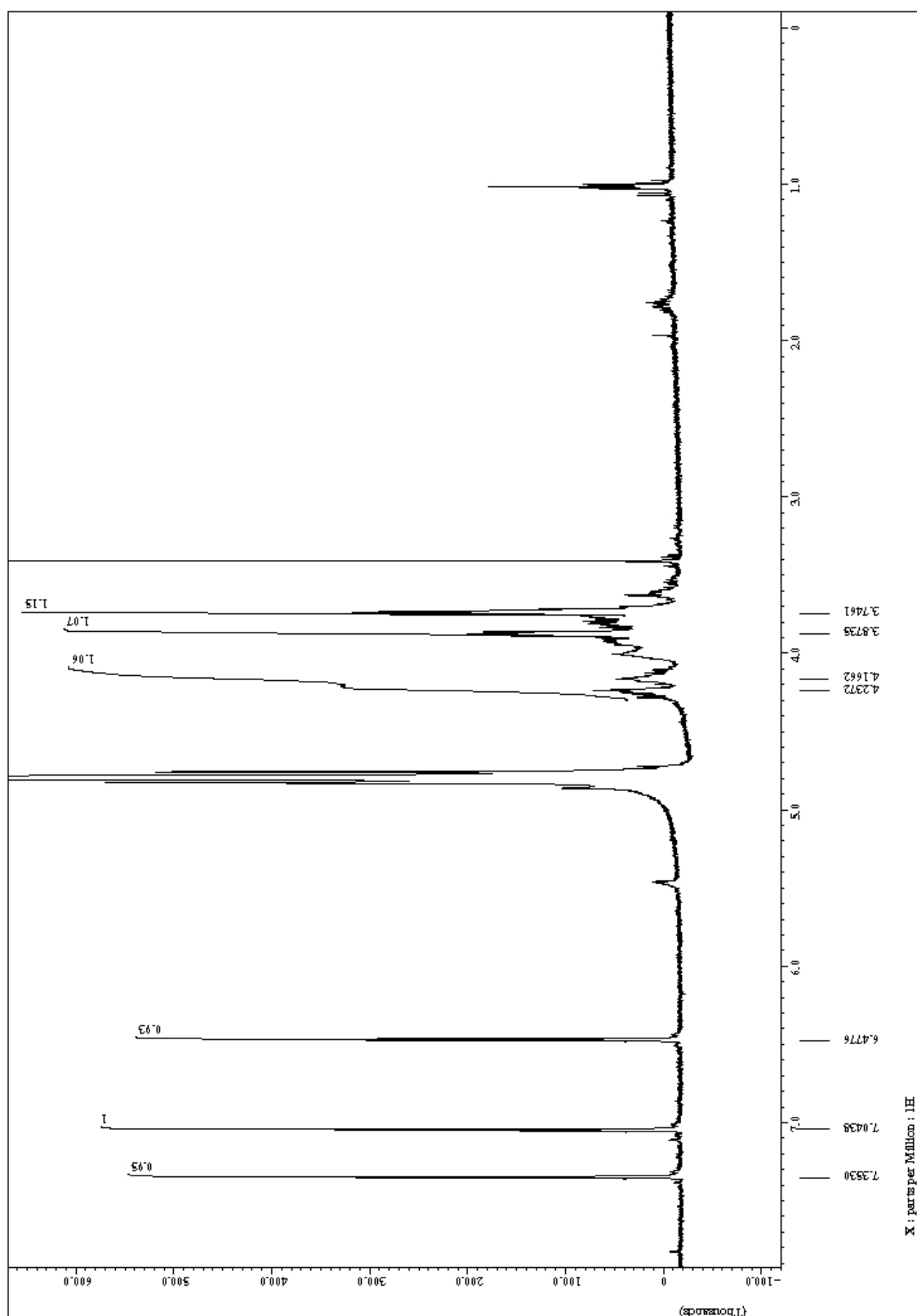
L-(+)-S-(3-Pyrrolyl) Cysteinsulfoxid:

HR-MS

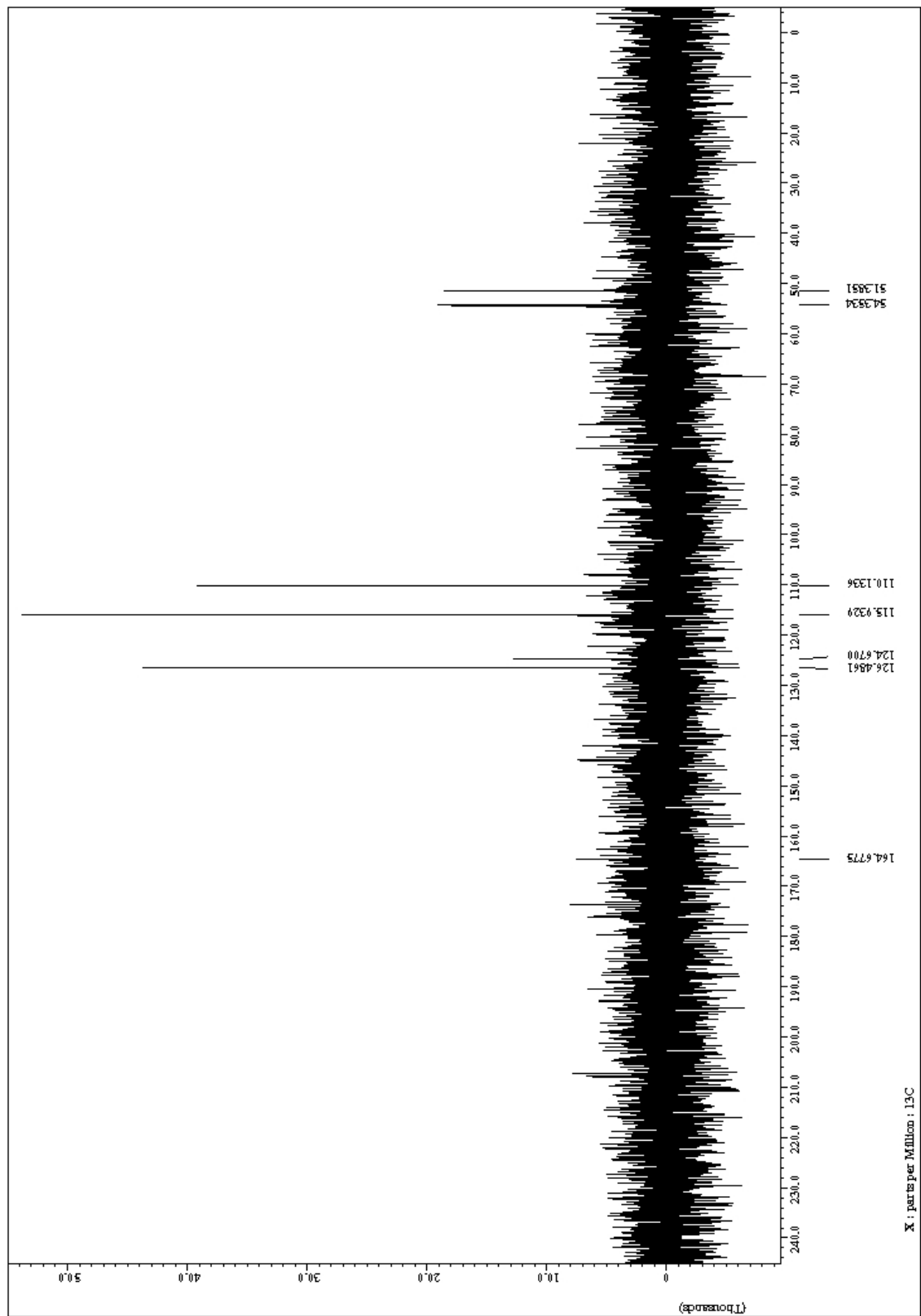




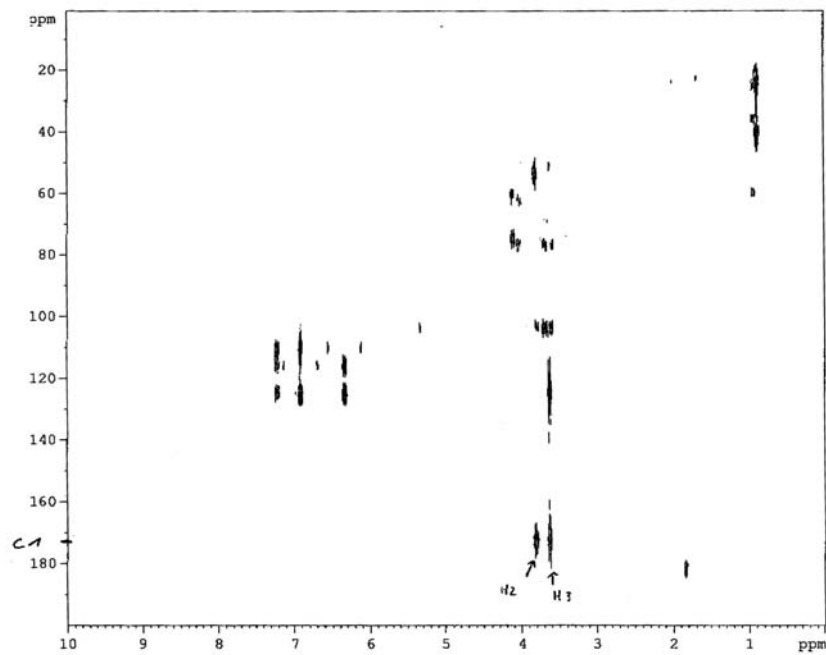
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum:



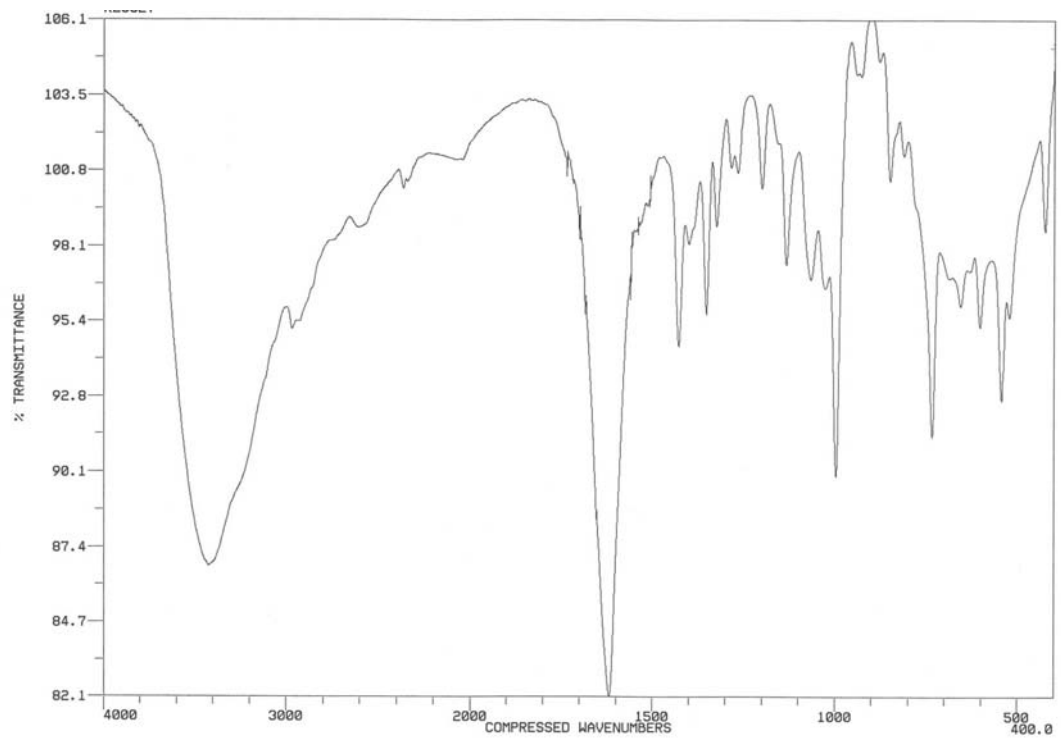
# <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum



# HMBC-NMR-Spektrum

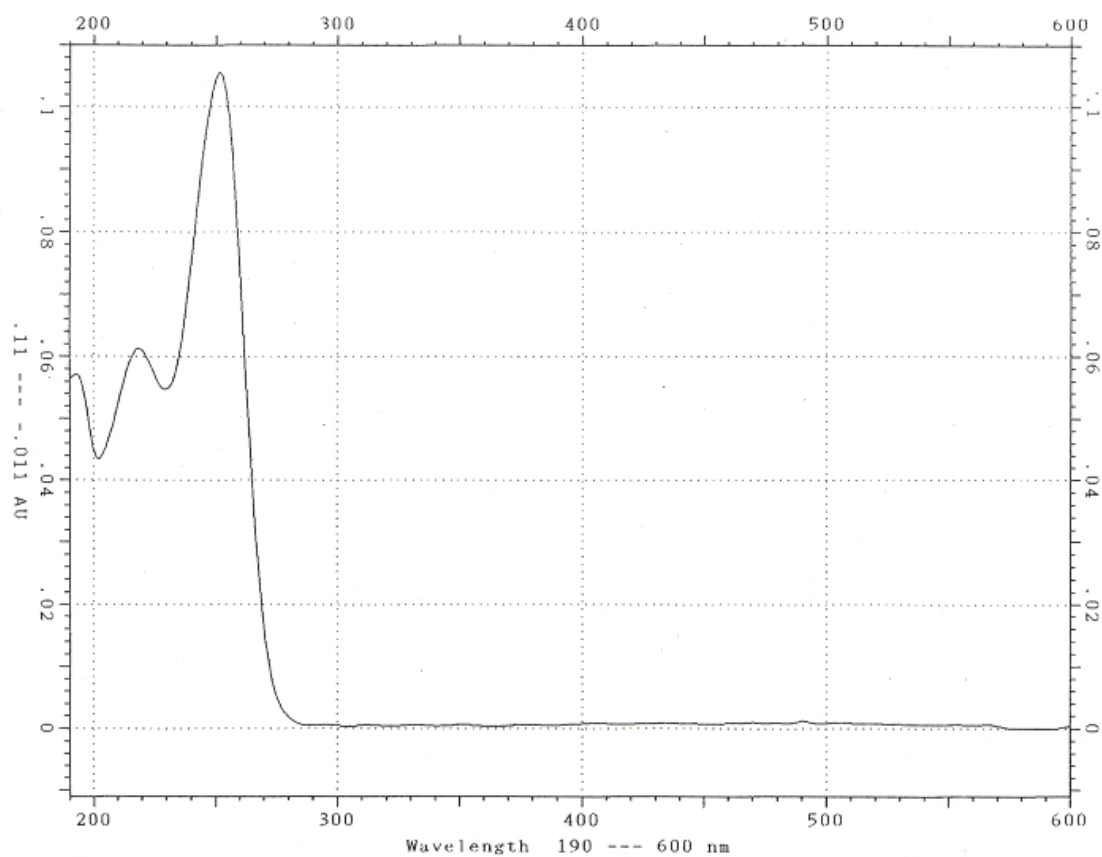


## IR-Spektrum:



Philipps-Universität  
 Inst. f. Pharm. Chemie  
 Nicolet FT-IR 510 P

## UV-Spektrum:



## **Publikationen**

### **Publikationen**

Jedelská, J., Vogt, A., Reinscheid, U.M., Keusgen, M. (2008) Isolation and Identification of a red pigment from *Allium* subgenus *Melanocrommyum*, *J. Agric. Food Chem.*, **56**(4), 1465-1470

Vogt, A., Keusgen, M. Purification and Characterisation of a novel enzyme involved in the biogenesis of a red pigment from *Allium* subgenus *Melanocrommyum*, in Vorbereitung

### **Kurzvorträge**

Isolation of a new enzyme of medicinally used *Allium* subgenus *Melanocrommyum* species growing in Central Asia,

Vogt, A., Fritsch, R.M., Keusgen, M., *Deutsche pharmazeutische Gesellschaft, joint meeting 2006, Marburg*, Oktober 2006, Abstract SL B08

New enzymatic aspects of *Allium* subgenus *Melanocrommyum* Species,

Vogt, A., Fritsch, R.M., Keusgen, M., *1. Kazbegi workshop on Botany, Taxonomy and Phytochemistry of wild Allium species of the Caucasus and Central Asia, Georgien*, Juni 2007

### **Poster Präsentationen**

Sulphurpyrrols – a new class of substances of medicinally used *Allium* species growing in Central Asia,

Vogt, A., Jedelská, J., Fritsch, R.M., Keusgen, M., *Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung 53rd annual congress, Florenz, Italien*, August 2005, Abstract ID P365

Isolation of an enzyme with catecholoxidase activity of medicinally used *Allium* subgenus *Melanocrommyum* species growing in Central Asia,

Vogt, A., Fritsch, R.M., Keusgen, M., *Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung 53rd annual congress, Florenz, Italien*, August 2005, Abstract ID P364

Sulphur Pyrroles from *Allium* subgenus *Melanocrommyum* – a new class of Pigments,

Keusgen, M., Vogt, A., Jedelská, J., Reinscheid, U.M., *Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung 5rd annual congress, Graz, Österreich*, September 2007, Abstract SL 008



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Anja Vogt  
Geboren: 11. Januar 1978 in Wuppertal  
Nationalität: deutsch

### **Schulbildung:**

1984-1988 ev. Grundschule Neviges, Velbert  
1988-1997 Nikolaus-Ehlen-Gymnasium in Velbert, Abschluss: Abitur

### **Studium:**

10/1997-07/2002 Studium der Lebensmittelchemie an der Bergischen Universität Wuppertal  
05/2002 Abschluss: 1. Staatsexamen

### **Praktische Ausbildung zum Lebensmittelchemiker:**

08/2002-10/2002 Gesellschaft für Umweltanalytik, Osnabrück  
11/2002-12/2002 Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt, Lüdenscheid  
01/2003-07/2003 Chemisches- und Lebensmitteluntersuchungsamt Hagen  
09/2003 2. Staatsexamen

### **Arbeitserfahrung:**

07/2004-03/2008 Promotionsstudium unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Marburg  
Seit 04/2008 Postdoc-Aufenthalt, Department of chemistry, University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada